



AGARSOLUBLOKKIMENETELMÄ PLEURA- JA ASKITESNÄYTTEIDEN IMMUNOHISTOKEMIAALLISISSA VÄRJÄYKSISSÄ

Paula Tamminen

Elina Virkkunen

Opinnäytetyö
Maaliskuu 2013
Bioanalytiikan koulutusohjelma

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU
Tampere University of Applied Sciences

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

TAMMINEN, PAULA & VIRKKUNEN, ELINA:

Agarsolublokkimenetelmä pleura- ja askitesnäytteiden immunohistokemiallisissa värjäyksissä

Opinnäytetyö 57 sivua
Maaliskuu 2013

Sytologisten effuusionäytteiden sisältämästä solumateriaalista saadaan arvokasta diagnostista informaatiota immunohistokemiallisten värjäysten avulla. Värjäyksissä antigeenejä osoitetaan niille spesifisten vasta-aineiden avulla. Sytologisten effuusionäytteiden kohdalla tarvitaan immunohistokemiallisia värjäyksiä erityisesti adenokarsinooman ja mesoteliooman erotteluun sekä erilaistuneiden karsinoomien luokitteluun.

Opinnäytetyö tehtiin Keski-Suomen keskussairaalan patologian laboratoriossa. Työn tarkoituksena oli valmistaa agarsolublokki sytologisesta effuusionäytteestä ja verrata sitä käytössä olevaan solublokkimenetelmään. Tavoitteena oli saada nykyistä parempi solusaanti näytelasille ja varmistaa immunohistokemiallisten värjäyksen toimivuus agarsolublokkimenetelmällä. Lisäksi tavoitteena oli huomioida alkoholifiksaation ajallinen vaikutus solujen lopulliseen värjäytyvyyteen.

Työn näytemateriaali koostui kymmenestä effuusionäytteestä (pleura- tai askitesneste). Effuusionäytteiden sisältämistä kudokspaleista tai sentrifugoinnin yhteydessä muodostuneesta solupelletistä valmistettiin agarsolublokki. Valmiista agarsolublokkivalmisteesta leikatut näyteleikkeet värjättiin immunohistokemiallisesti polymeeri-tekniikkaa käyttäen. Näytteet värjättiin sytokeratiini 7-, sytokeratiini 20-, kalretiniini- ja TTF-1- vasta-aineilla.

Immunohistokemiallisissa värjäyksissä agarsolublokki- ja solublokkimenetelmän välillä yhteneväisimmät tulokset saatiin sytokeratiini 7:n kohdalla. Kalretiniinin ja TTF-1:n kohdalla tuloksissa oli enemmän poikkeamia. Sytokeratiini 20 on negatiivinen työssä käytetyissä pleura- ja askitesnäytteissä. Sytokeratiini 20:n värjäystulos tukee agarsolublokkimenetelmän toimivuutta, koska virheellisiä positiivisia tuloksia ei todettu. Alkoholifiksaation kesto vaihteli eri näytteiden välillä, 2 päivästä 69 päivään. Pisimpään säilytetty näyte oli liian hajonnut arviointia varten. Alkoholifiksaatioaika selittää ainakin osan kalretiniinin ja TTF-1:n tuloksista. Lisäksi on hyvä huomioida, että työn näytemateriaali koostui soluista, jotka olivat jääneet yli varsinaisen diagnostisen solublokin teosta. Tämän takia diagnostisia soluja ei ollut riittävästi kaikissa näytteissä.

Asiasanat: agarsolublokki, immunohistokemia, effuusionäyte, alkoholifiksaatio

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

TAMMINEN, PAULA & VIRKKUNEN, ELINA:
Immunohistochemical Staining of Pleural and Ascites Fluid Samples in Agar Cell Block Method

Bachelor's thesis 57 pages
March 2013

The cell material of the cytological effusion samples provides highly valuable diagnostic information when immunohistochemical staining methods are used. Immunohistochemical stains are used to indicate antigens with specific antibodies. Immunohistochemical stains are needed for the cytological effusion samples particularly for the distinction between an adenocarcinoma and mesothelioma and also for the classification of differentiated carcinomas.

The research for this Bachelor's Thesis was conducted in the Pathology Laboratory of the Central Finland Central Hospital. The purpose was to produce an agar cell block from a cytological effusion sample and compare it to the current cell block method. The aim was to gain a better cell yield onto the sample glass and confirm the functionality of the agar cell block method in the immunohistochemical staining. The aim was also to observe the temporal effect of alcohol fixation on the final staining result.

The sample material for the work consisted of ten effusion samples (pleural or ascites fluid samples). An agar cell block was made from the pieces of tissue included in the effusion samples or from the cell pellet material formed by the centrifugation of the effusion samples. The finished sample sections from the agar cell block material were stained by using a polymer-based immunohistochemical technique. The samples were stained with the cytokeratin 7-, cytokeratin 20-, calretinin- and TTF-1- antibodies.

In the immunohistochemical staining the results for the agar cell block method and for the cell block method were the most consistent with the cytokeratin 7. The results for the calretinin and TTF-1 had more deviations. With the pleural and ascites fluid samples cytokeratin 20 is negative. The results for the cytokeratin 20 support the functionality of the agar cell block method, because there were no false positive results. The length of the alcohol fixation varied between the samples from two days to 69 days. The sample that had been fixated for the longest period of time was too broken-down for evaluation. The length of alcohol fixation accounts for some of the results for the calretinin and TTF-1. It also needs to be pointed out that the sample material consisted of cells which were left over from the original diagnostic cell block. For this reason there were no diagnostic cells in every sample.

Key words: agar cell block, immunohistochemistry, effusion sample, alcohol fixation

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	PLEURA- JA ASKITESNÄYTTEET	7
	2.1. Keuhkopussi ja vatsakalvonontelo.....	7
	2.2. Effuusio.....	8
	2.3. Indikaatiot effuusion tutkimiselle	9
3	KASVAINTEN LUOKITTELU	11
	3.1. Adenokarsinooma	11
	3.2. Maligni mesoteliooma	12
4	SOLUBLOKKIVALMISTE	13
	4.1. Solublokki	13
	4.2. Agarsolublokki.....	13
5	NÄYTTEIDEN FIKSOINTI	15
	5.1. Alkoholifiksaatio.....	15
	5.2. Formaliinifiksaatio	16
	5.3. Histologinen näytteen käsittely.....	16
	5.4. Värjäysmenetelmät	18
6	IMMUNOHISTOKEMIAALLISET VÄRJÄYKSET	20
	6.1. Vasta-aineet.....	20
	6.2. Polyklonaaliset ja monoklonaliset vasta-aineet	22
	6.3. Näytteiden esikäsittely immunohistokemiassa	22
	6.4. Immunohistokemiaalliset värjäysmenetelmät	23
	6.5. Taustavärjäytyminen.....	24
	6.6. Käytetyt kontrollit ja värjäystuloksen tulkita.....	26
7	NÄYTTEISTÄ PAIKANNETUT ANTIGEENIT	28
	7.1. Sytokeratiini 7 ja 20	28
	7.2. Kalretiniini	30
	7.3. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1).....	30
8	TYÖN TARKOITUS JA TUTKIMUSKYSYMYKSET	31
9	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	32
10	TYÖN EETTISYYS.....	33
11	TYÖN LUOTETTAVUUS	34
12	OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	35
13	MIKROSKOPOINTI JA TULOKSET.....	44
	13.1. Sytokeratiini 7 ja 20	45
	13.2. Kalretiniini ja TTF-1	47
14	TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA	50
	LÄHTEET.....	53

1 JOHDANTO

Rudolf Virchow esitti jo vuonna 1859, että koska solu on elämän perusyksikkö, tulee sairauden syytä hakea solutasolta (Mäkinen & Lehto 2012b, 10). Patologian laboratoriossa tutkitaan solujen, kudosten ja elinten rakenteita ja niiden muutoksia erilaisissa sairauksissa tai tautitiloissa. Laboratorion toimintaan kuuluu kemiallisten ja geneettisten häiriöiden merkityksen selvittäminen solutasolla sekä sairauksiin liittyvien muutosten kuvantaminen. (Mäkinen & Lehto 2012a, 11.) Immunohistokemialla tarkoitetaan histologisesta näytteestä tehtävää antigeenin osoitusta. Indikaationa immunohistokemian värjäyksissä on pääasiassa syövän diagnosointi ja luokittelu. (Mäkinen & Stenbäck 2012a, 1135–1137.)

Syöpien hoitomuodot ovat kehittyneet huomattavasti viime vuosien aikana. Kasvaimen histologinen diagnosointi edellyttää aina solu- tai kudoksenäytteiden analyysia. Oikean hoidon valinta edellyttää sekä mahdollisimman täsmällistä histologista että immunohistokemiallista tyypitystä. (Lappi-Blanco ym. 2012a.) Sytologisia effuusionäytteitä voidaan käyttää apuna adenokarsinooman ja mesoteliooman erottelussa sekä tarkentaa huonosti erilaistuneiden karsinoomien luokittelua (Nathan, Narayan, Smith & Horn 2000; Lappi-Blanco ym. 2012a).

Opinnäytetyössä verrataan agarsolublokkimenetelmällä ja solublokkimenetelmällä valmistettujen näytteiden immunohistokemiallista värjäytyvyyttä. Työn näytemateriaali koostuu pleura- ja askitesnäytteiden sisältämistä kiinteistä kuduskappaleista sekä mahdollisesta sentrifugoinnin yhteydessä muodostuvasta solupelletistä. Effuusionesteestä havaituista näytemateriaaleista tehdään rutiinisti solublokkivalmiste patologian laboratoriossa. Agarsolublokkimenetelmällä on tarkoitus saada sidottua entistä suurempi solumäärä yhteneväiseksi näytteeksi ja estää materiaalihävikki mahdollisimman tehokkaasti. Näyteleikkeet värjätään immunohistokemiallisin värjäyksin. Värjäyksissä käytetään sytokeraatiini 7, sytokeraatiini 20, kalretiniini ja TTF-1 –vasta-aineita. Lisäksi tavoitteena on huomioida alkoholifiksaation vaikutus solujen lopulliseen värjäytyvyyteen.

Erilaisten fiksaatio- ja käsittelymenetelmien vaikutuksesta sytologisten näytteiden immunohistokemiallisiin värjäyksiin on tehty opinnäytetöitä aikaisemmin. Opinnäytetöissä on todettu, että antigeeneistä parhaiten käsittelyä ovat kestäneet sytokeraatiinit. Alkoholi-

fiksaatio on aiheuttanut vääriä negatiivisia tuloksia kalretiniinin kohdalla. Lisäksi on havaittu, että immunohistokemialliset värjäykset onnistuvat parhaiten tuorenäytteistä. (Sorvali 2005; Suokas & Tiihonen 2009.) Agarsolublokkimenetelmän käytännön toteutuksissa on eroavuuksia, joista Sorvali (2005) on todennut parhaimmaksi toimintatavaksi solujen sekoituksen agariin pienellä ravistuksella. Hellävarainen sekoitus saa solut pysymään paremmin lähellä pohjan reunamia (Sorvali 2005).

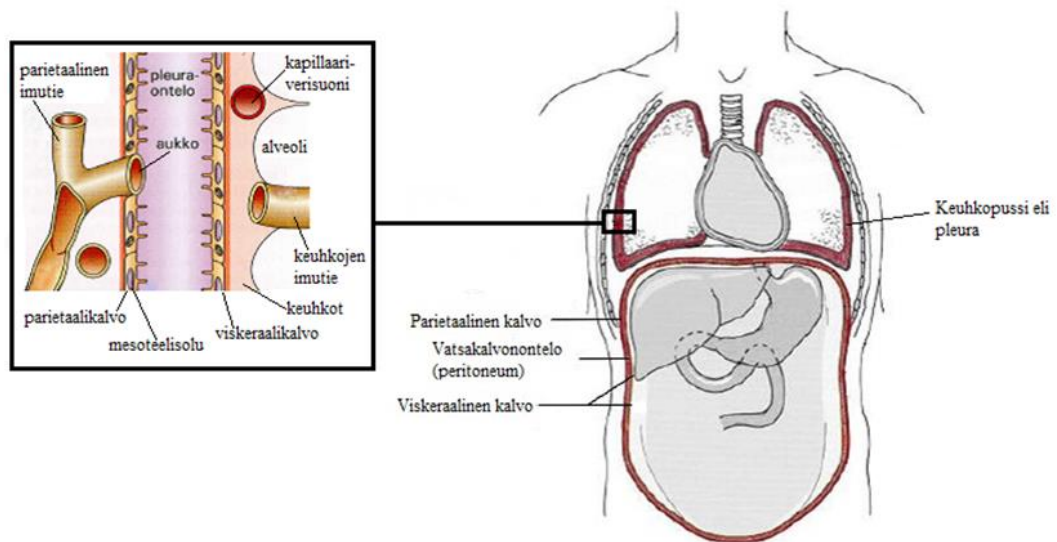
2 PLEURA- JA ASKITESNÄYTTEET

Työssä näyttemateriaalina käytetään pleura- ja askitesnäytteitä ja niistä saatua solumateriaalia. Pleuranesteen kertymiseen liittyy yleensä mekaaninen tekijä, joka ei välttämättä viittaa keuhkopussiin levinneeseen syöpään. Yli puolet pleuranestekertymistä sisältää yleensä kasvainsoluja ja antaa viitteitä pahanlaatuisesta kasvaimesta, jonka aiheuttajana voi olla keuhko-, rinta- tai ruoansulatuskanavan syöpä tai mesoteliooma. (Huuskonen, Jahkola & Oksa 2009.)

2.1. Keuhkopussi ja vatsakalvonontelo

Keuhkopussi (pleura) ja vatsakalvonontelo (peritoneumontelo) kuuluvat elimistön serooseihin eli nesteisiin onteloihin. Muita serooseja onteloita ovat sydänpussi ja kivespussi. Onteloita yhdistää samankaltainen umpinainen kaksilehtinen perusrakenne. Uloimpaa kalvoa kutsutaan parietaaliseksi lehdeksi ja sisempää elimiä verhoavaa kalvoa viskeraaliseksi lehdeksi. (Sand ym. 2011, 361–362, 384–387.) Kalvot rakentuvat litteästä tai kuutiomaisesta mesoteelisolukosta ja sidekudoksesta (Taskinen 1994, 297).

Parietaalisen ja viskeraalisen kalvon välissä on pieni määrä voitelevaa nestettä, jonka tehtävänä on vähentää kitkaa kalvojen välillä. Tämä mahdollistaa elinten vaivattoman liikkeen ja toisaalta pitää ontelon kalvot kiinni toisissaan, esimerkiksi hengitysliikkeen aikana. (Sand ym. 2011, 361–362, 384–387.)



KUVA 1. Pleura- ja vatsakalvon ontelo (Brunzel 2004, 362, muokattu; Halme 2005, 598, muokattu)

2.2. Effuusio

Serooseissa onteloissa nesteen suodattuminen ja imeytyminen tapahtuvat veren plas-
masta. Tasapainotilan häiriintyessä seurauksena voi olla nesteen kertyminen onteloihin
eli effuusio, joka on patologinen ilmiö. (Taskinen 1994, 297.) Seroosien onteloiden nes-
teily aiheutuu yleensä karsinoomasolujen tukkiessa onteloiden imusuonia (Halme 2005,
599). Nesteen lisäksi effuusio voi sisältää kasvainten erittämää limaa (Taskinen 1994,
297). Keuhkopussiin kertyvää effuusiota kutsutaan pleuranesteeksi ja vatsakalvononte-
loon kertyvää effuusiota askitesnesteeksi (Holli & Saarto 2009; Riska & Saarelainen
2011).

Effuusiota on kahta eri tyyppiä, jotka jaetaan niiden muodostumistavan ja koostumuk-
sen perusteella eksudaatteihin ja transsudaatteihin. Transsudaatti sisältää vähän prote-
iineja ja soluja. Transsudaatti on ulkonäöltään yleensä kirkasta tai vaalean kellertävää.
Tilalle on yleistä, että nestettä muodostuu enemmän kuin imeytyy takaisin, vaikka imu-
teiden rakenne on normaali. Transsudaattien syynä on usein verenkiertohäiriö (systee-
minen häiriö) tai pienentynyt veren proteiinipitoisuus (sydämen vajaatoiminta tai mak-
sa- tai munuaissairaus). (Taskinen 1994, 297–299; Riska & Saarelainen 2011.)

Eksudaatti sisältää enemmän proteiineja ja soluja kuin transsudaatti. Eksudaatin erittymiseen liittyy yleensä kapillaarisuonien seinämän vaurio, jonka seurauksena veriplasmaa tihkuu onteloon. Vaurion takana on yleensä tulehdus, kasvain tai trauma. Esimerkiksi kasvainmassa aiheuttaa imuteiden tukkeutumisen ja lisää ontelon kalvon läpäisevyyttä. Muita effuusion syitä voivat olla yliherkkyyssreaktiot, kollageenisairaudet ja lääkeainereaktiot. (Taskinen 1994, 297–299; Riska & Saarelainen 2011.) Taulukossa 1 on lueteltu transsudaattien ja eksudaattien eroja.

TAULUKKO 1. Transsudaattien ja eksudaattien eroja (Taskinen 1994, 298, Halme 2005, 602; Riska & Saarelainen 2011)

	Transsudaatti	Eksudaatti
Väri	kirkas tai vaalean kellertävä	sakea
Proteiinipitoisuus	alle 30 g/l	yli 30 g/l
Solujen määrä	niukka	runsas
leukosyyttejä	vähän	paljon
Mesoteeliatypia	niukasti	vaihtelevasti
Kapillaarisuonien kunto	normaali	seinämät vaurioituneet
Muodostumistapa	muutokset hydrostaattisessa paineessa sekä kapillaarivrenkierrossa	kapillaarisuonten vauriosta johtuva lisääntynyt tihkuminen suonien seinämän läpi
Effuusion syitä	verenkiertohäiriö sydämen vajaatoiminta maksa- tai munuaissairaus keuhkoveritulppa (20 %) hypotyreoosi	kasvaimet tulehdukset tai infektiot traumat keuhkoveritulppa(80 %) asbestoosi

2.3. Indikaatiot effuusion tutkimiselle

Effuusion vaikutuksesta seroosisten kalvojen mesoteelisolut kasvavat, pyöristyvät ja niiden lukumäärä lisääntyy. Sen aiheuttaman paineen ja solumuutosten vuoksi mesoteelisoluja ja solukasoja irtoaa nesteeseen normaalia enemmän. Jos effuusio on eksudaattia ja sen syy on tuntematon, voidaan effuusion sisältämien solujen tyypillisyyttä selvittää

sytologisella diagnostiikalla. Sytologisen diagnostiikan indikaatioita on listattu taulukossa 2. (Taskinen 1994, 7, 299–300.)

TAULUKKO 2. Indikaatiot effuusion sytologiselle tutkimiselle (Taskinen 1994, 298)

Malignien kasvaimien toteaminen ja erotusdiagnostiikka	Benignit effuusioid (maligniteetin poissulku ja erotusdiagnostiikka)
<ul style="list-style-type: none"> - Maligni mesotelioma - Primaari maligni adenokarsinoma - Metastoitunut maligni adenokarsinoma 	<ul style="list-style-type: none"> - Benigni mesotelioma - Krooniset tulehdukset - Reaktiiviset effuusioid infarkteissa, perforaatioissa, allergioissa ja lääkeaineallergioissa - Muut sairaudet, esimerkiksi sydämen vajaatoiminta, munuais- ja maksasairaudet

3 KASVAINTEN LUOKITTELU

Kasvainten luokittelu tapahtuu niiden alkuperän ja rakenteen perusteella. Lisäksi nimeämiseen vaikuttaa kliiniseen käytäntöön liittyvä oppi hoitovasteista ja kasvainten käyttäytymisestä. Kasvain luokitellaan hyvänlaatuiseksi eli benigniksi tai pahanlaatuiseksi eli maligniksi. Benigni kasvain on tyypillisesti selkeästi rajautunut, kun taas malignin kasvaimen soluihin voi liittyä levinneisyyttä muualle kudoksiin tai etäpesäkkeiden muodostumista. Lisäksi benigni kasvain voi sisältää piirteitä kudoksen alkuperäisestä solukosta. Malignit kasvaimet ovat yleensä nopeasti kasvavia ja leviäviä. On olemassa myös niin sanottuja rajalaatuisia kasvaimia, joiden ominaisuudet paljastuvat myöhemmin ja ne voivat liittyä esimerkiksi metastaasien kehittymiseen. (Lehto & Stenbäck 2012a, 231–232.)

Syöpäkudoskasvaimelle on tyypillistä invasiivinen kasvu ja pesäkkeiden muodostumiskyky, joihin liittyy kyky irrota alkuperäisestä solu- ja kudosjoukosta ja kyky tunkeutua ympäristöönsä. Muualla elimistössä ne voivat muodostaa uuden kasvaimen jolloin puhutaan etäpesäkkeestä eli metastaasista. Näistä ominaisuuksista johtuen maligneihin kasvaimiin liittyvä ennuste on huono. (Lehto & Stenbäck 2012b, 233.)

3.1. Adenokarsinooma

Adenokarsinooma on pahanlaatuinen kasvain, joka luokitellaan ei-pienisoluisen keuhkosyövän alatyyppeihin, johon kuuluu myös pienisolukarsinooma, levyepiteelikarsinooma, suurisoluinen karsinooma sekä muut harvinaisemmat karsinoomat. Suomessa keuhkosyövistä vajaat 80-prosenttia on ei-pienisoluisia karsinoomia, joista adenokarsinoomien osuus on kasvanut viime vuosien aikana. (Mali, Ojala & Salo 2007, 278–280.)

Adenokarsinooma muodostaa rauhasmaisia rakenteita, joissa solut ovat yleisesti kookkaita ja sijoittuvat pallomaisiin soluryppäisiin. Solut sisältävät runsaasti sytoplasmaa ja tumat ovat hypokromaattisia ja poikkeavan näköisiä. Kasvain saattaa erittää myös limaa, mikä voidaan todeta happamat ja neutraalit lima-aineet erottelevan Alcian Blue-PAS- värjäyksen avulla. (Lappi-Blanco ym. 2012b, 551–553.)

Tupakointi on adenokarsinooman suurin riskitekijä. Samalla adenokarsinooma on pahanlaatuisista keuhkokasvaimista myös vähiten tupakkariippuvainen ja sitä todetaan myös tupakoimattomilla, sekä nuorilla alle 40-vuotiailla potilailla. (Mali ym. 2007, 278–280; Pirinen ym. 2012, 547–548.)

3.2. Maligni mesoteliooma

Maligni mesoteliooma esiintyy yleisimmin pleurassa ja harvemmin muissa seroosissa onteloissa, kuten vatsakalvossa. Primaarinen kasvain saa alkunsa seroosisten onteloiden mesoteelisolukosta. Kyseessä on pahanlaatuinen kasvain, joka saa yleensä alkunsa asbestialtistuksesta. Mesotelioomat jaotellaan kahteen ryhmään, harvinaisempaan paikalliseen tyyppiin sekä huonoennusteiseen diffuusityyppiin. Maligni mesoteliooma kuuluu huonoennusteiseen diffuusityyppiin. (Huuskonen ym. 2009; Anttila, Kaarteenaho & Pääkkö 2012, 561.)

Sairaus todetaan yleensä kasvainkyyhmyinä parietaali- ja viskeraalipleurassa, jossa myöhemmin yhtenäinen kasvainkudos täyttää pleuraontelon ja ympäröi keuhkoa selkeänä tuumorina. Kasvain voi suurentua rintakehän seinämän läpi ja lähettää metastaaseja esimerkiksi keuhkoihin, maksaan, lisämunuaisiin ja rintaontelon imusolmukkeisiin. (Anttila ym. 2012, 561.)

Maligni mesoteliooma luokitellaan histologisesti useaan eri alatyyppiin; epiteloidiin, sarkomatoidiin, desmoplastiseen ja sekamuotoiseen eli bifaasiseen tyyppiin, jotka poikkeavat solutasolla toisistaan. Epiteloidi tyyppi ilmenee muun muassa solun sisältämän runsaan sytoplasman ja pyöreämuotoisten tumien perusteella, kun taas sarkomatoidissa mesotelioomassa solut voivat poikkeavasti olla sukkulamaisia. (Anttila ym. 2012, 561–562.)

4 SOLUBLOKKIVALMISTE

Effuusionäytteessä saatetaan havaita pieniä irtonaisia kudospaloja, joista voidaan valmistaa muun käsittelyn lisäksi solublokki histologisen näytteen lailla (Mäkinen & Stenbäck 2012b). Solublokkimenetelmä on luotettavin näytteen käsittelymuoto immunohistokemiallisten värjäysten onnistumisen suhteen (Aho 2000, 142).

Onnistuneen solublokkivalmisteen edellytyksenä on niukan solumateriaalin sitominen yhteneväiseksi näytteeksi, jotta näyte voidaan käsitellä ja valaa parafiiniin. Menetelmä on haastava, mutta tehokas, sillä jos niukka materiaali saadaan sidottua yhteneväiseksi näytteeksi, voidaan sen avulla saada klinikolle informatiivista tietoa. (Nathan ym. 2000; Lappi-Blanco ym. 2012a; Mäkinen & Stenbäck 2012b.)

4.1. Solublokki

Solublokkivalmiste tehdään laboratoriossa rutiinisti näytteessä ilmenneistä kuduskappa-leista. Sentrifugoimalla näytteestä saadaan eroteltua solumateriaali ja supernatantti. Solumateriaali siirretään tiiviiseen kudospussiin, jolloin soluhävikki jää mahdollisimman pieneksi tulevien käsittelyvaiheiden aikana. Näytteen alkoholifiksatiivi saadaan poistettua, kun solut sentrifugoidaan ensin koeputken pohjalle pelletiksi. Kudospussi laitetaan näytekasettiin ja kudokset fiksoidaan huoneenlämmössä 10-prosenttisessa formaliinissa riittävän kauan ennen histologista käyntiinpanoa. (Nathan ym. 2000; Holliday 2004; 18; KSSH 2012a.)

4.2. Agarsolublokki

Työssä agarsolublokkivalmiste tehdään muun effuusionesteen tutkimuksen yhteydessä jäljelle jääneestä solumateriaalista. Menetelmässä käytetään agariala, jonka tarkoituksena on sitoa yhteen niukka näytemateriaali ja suojata näytettä prosessoinnin vaiheiden aikana, esimerkiksi pinsettien aiheuttamalta vauriolta. Supernatantti poistetaan samalla tavalla kuin solublokkimenetelmässä, jonka jälkeen solupelletti sekoitetaan agariala. Agarsoluseoksen annetaan jähmettyä jääkaapissa. Kiinteä agarsolunappi poistetaan putkesta ja leikataan siivuiksi näytekasettiin. Näytekasetti siirretään 10-prosenttiseen for-

maliiniin fiksoitumaan samalla tavalla kuin solublokki. (Kerstens ym. 2000; Marian sairaala 2003; Sorvali 2005, 141–142, Kirjavainen 2013, 28.)

5 NÄYTTEIDEN FIKSOINTI

Fiksaatio eli kiinnittäminen on yksi pääasioista näytteiden käsittelyssä. Sen avulla näyttemateriaali säilytetään mahdollisimman alkuperäisen kaltaisena. (Grizzle, Fredenburg & Myers 2008, 53; Zanini ym. 2012.) Laboratoriot kehittelevät omat variaationsa näytteiden käsittelyyn liittyvien käytäntöjen suhteen. Näytteiden fiksointi eli kiinnitysmahdollisuuksia on useita, mutta kuitenkin yksikään niistä ei täysin kykene kattamaan tavoitteen mukaisia vaatimuksia. (Holliday 2004, 16–17; Naukkarinen 2006a, 7.) Fiksointi vaikuttaa näytteen käsiteltävyyteen kuten sen leikkautuvuuteen, värjäytyvyyteen ja morfologiaan (Naukkarinen 2006a, 10). Kun näyte irrotetaan potilaasta, tulisi näytteen fiksoimisen tapahtua viipymättä, jotta immunohistokemiallisten menetelmien toimivuus ei kärsisi (Mäkinen & Stenbäck 2012a, 1133).

Fiksoinnin ensisijainen tavoite on estää näytteen autolyysi inaktivoimalla soluja hajottavia entsyymejä ja tuhoamalla mikrobeja. Lisäksi proteiinien onnistunut fiksoituminen on edellytys laadukkaaseen valomikroskooppinäytteeseen. (Hopwood 2003, 63–64; Holliday 2004, 16–17; Naukkarinen 2006a, 7.) Näytteen fiksoitumiseen voidaan vaikuttaa muun muassa lämpötilan säätelyllä, koska matala lämpötila laskee autolyysin ja diffuusion vaikutusta kun taas lämpötilan noustessa fiksaatio nopeutuu. Käytetyllä fiksaatioajalla on suuri merkitys näytteen edustavuuteen. (Naukkarinen 2006a, 8–9.)

5.1. Alkoholifiksaatio

Sytologiset näytteet voidaan kiinnittää käyttämällä koaguloivia fiksatiiveja, joista käytetyimpiä ovat alkoholit (etanoli ja metanoli) sekä asetoni (Grizzle ym. 2008, 55). Työssä käytetty kiinnitysaine on alkoholipohjainen fiksatiivi, 50-prosenttinen etanoli. Etanolilla fiksoidut solut kestävät paremmin käsittelyä, kuten sentrifugointia, formaliinifiksointia ja muuta histologista prosessia. Kyseisen fiksaatiomuodon etuna on sen nopeus, koska etanoli tunkeutuu nopeasti solukkaan ja poistaa sieltä veden. Se voi kuitenkin aiheuttaa fiksaatioartefaktana solujen kutistumista. (Aho 2000, 142; Naukkarinen 2006a, 7–8; Grizzle ym. 2008, 55–56.)

5.2. Formaliinifiksaatio

Formaldehydi on aldehydeihin kuuluva kaasu, jonka 10-prosenttista vesiliuosta eli formaliniä on käytetty laboratorioissa fiksatiivina jo 1900-luvun loppupuolelta lähtien. Formaliniä kuluu tuhansia litroja vuodessa rutiinissa laboratoriokäytössä. Formaliinin etuna on sen edullisuus ja lisäksi sitä on helppo valmistaa suuria määriä kerrallaan. Haittapuolena on aineen toksisuus ja karsinogeenisuus. Formaliinikäsittelyn tilalle on tullut vaihtoehtoja kuten mikroaaltouunikäsittely sekä sinkkipohjaiset kiinnitysaineet. (Zanini ym. 2012.)

Formaliinipohjaista fiksatiivia käytettäessä kudoksen proteiinit reagoivat formaliniin aldehydiryhmiensä kanssa muodostaen ristosiltoja. Ristosiltojen muodostama verkkomainen rakenne pitää kudosten sijainnin toisiinsa nähden muuttumattomana, jolloin kudokset säilyvät morfologialtaan alkuperäisen kaltaisena. Kudoksen antigeenit peittyvät ristosilloilla ja niitä myös tuhoutuu formaliniin vaikutuksesta. (Grizzle ym. 2008, 53–54; Ikeda, Tate, Suzuki & Mitsuya 2011.) Ristosillat vaikeuttavat vasta-aineiden kulkeutumista antigeeniepitooppien luo, mutta sidokset ovat palautuvia, joten kudoksen epitoopit voidaan paljastaa jälkikäteen sopivalla käsittelyllä (Hopwood 2003, 64–65).

Fiksaatioon vaikuttaa kiinnitysaineen määrä suhteessa kudoksen kokoon, eli kuinka tehokkaasti kiinnitysaine pääsee tunkeutumaan kudokseen kauttaaltaan (Spencer & Bancroft 2008, 83). Holliday (2004, 18–19) mainitsee yleisimmäksi käsittelyvirheeksi niin sanotun alifiksaation, eli kudokset eivät ehdi fiksoitua riittävästi. Ihanteellinen näytteen fiksaatioaika formaliinissa on 12–18 tuntia. Liian pitkä fiksoituminen tuhoaa entsyymien ja antigeeniaktiivisuuksia ja aiheuttaa artefaktana formaliinipigmentin muodostumista. (Naukkarinen 2006a, 9.)

5.3. Histologinen näytteen käsittely

Kun näyte irrotetaan potilaasta, tapahtuu sarja prosesseja, joiden tulee tukea laadukasta mikroskooppilla todettavaa lopputulosta. Välittömän esikäsittelyn merkitys on suuri ja kun kudokset on kauttaaltaan fiksoituneet, ne voidaan prosessoida edelleen. (Spencer & Bangroft 2008, 83.) Esikäsittelyn jälkeen näytteet siirretään kuduskuljetusautomaattiin, jonka valmiiseen ohjelmaan on säädetty tarkka aika, lämpötila ja alipaine. Käsittely

tapahtuu 45 °C:en lämpötilassa, joka pitää kudoksen rakenteen muuttumattomana, mahdollistaa näytteiden säilyvyyden ja kovettaa kudusrakenteita. (Spencer & Bangroft 2008, 84; Mäkinen 2012, 1128.)

Kuduskuljetuksessa fiksoitu kudos kuljetetaan tukiaineeseen erilaisten vaiheiden kautta. Aluksi kudokseen sitoutumaton fiksatiivi huuhdellaan pois veden avulla. Koska vesi ja parafiini eivät kykene sekoittumaan keskenään, on vesi ensin poistettava asteittain tapahtuvan dehydraation avulla. Vedenpoisto tapahtuu nousevassa alkoholisarjassa, jossa alkoholipitoisuutta nostetaan vähitellen 70-prosenttisesta 100-prosenttiseen. Näin välte-
tään myös osmoottinen shokki. (Holliday 2004, 22; Spencer & Bangroft 2008, 84.)

Seuraava vaihe sisältää näytteen kirkastamisen ksyleenillä, joka tekee näytteestä myös kuultavan. Ksyleeni on palava, väritön neste, jolla on tunnusomainen haju. Ksyleeni toimii hyvin histologisessa prosessissa, sillä se sekoittuu useimpiin orgaanisiin liuottimiin ja parafiiniin. Se voidaan myös kierrättää. Kudoksen yliaikainen käsittely voi kovettaa kudoksen. (Spencer & Bangroft 2008, 86). Spencer ja Bangroft (2008, 86) esittelevät myös vaihtoehtoisia aineita kirkastukselle, joita ovat esimerkiksi tolueeni, kloroformi, metyyliisalisylaatti ja sitrushedelmäöljy.

Käsittelyn jälkeen kudos voidaan valaa parafiiniblokiksi. Kudos kyllästetään juoksevala vahalla (60 °C), mikä luo matriksin näytteen ympärille. Näyteketit nostetaan valua-
automaattiin, joka pitää kudoksen lämpötilan avulla edelleen pehmeänä ja käsittelykun-
toisena. On tärkeää, että näyte valetaan oikealla tavalla eli leikkauspinta alaspäin. Pinse-
teillä tarkasti aseteltu näyte valetaan juoksevaan parafiiniin ja sen annetaan jähmettyä
kylmälevyllä. Parafiinivaha on edullinen ja laadukas aine, jonka avulla näyte säilyy
muuttumattomana. Parafiini mahdollistaa näytteen arkistoinnin ja myöhemmän käytön,
niin histologisissa kuin myös muissa erikoistekniikoissa. (Holliday 2004, 22; Spencer &
Bangroft 2008, 86–87.)

Näyteblokki irrotetaan valumuotista sen jäähtyttyä tarpeeksi, jonka jälkeen blokista
voidaan leikata mikrotomilla (yleensä 1-2 µm:n) ohuita leikkeitä. Mikrotomeja on ma-
nuaalisia, puolimanuaalisia ja täysin automaattisia ja useimmat mikrotomeista on suun-
niteltu juuri parafiiniblokkien leikkaamiseen. Leikatut leikkeet siirretään huoneenläm-
pöisen vesiastian ja lämpimän oikaisuhauteen kautta objektilasille, jonka jälkeen objek-

tilasit laitetaan kuivumaan lämpölevylle, jotta näyteleike kiinnittyy objektilasille. (Spencer & Bangroft 2008, 93–95).

Leikattaessa näyteleikkeitä immunohistokemiallisia värjäyksiä varten vesihauteessa ei käytetä gelatiinia ja leikkeet siirretään positiivisesti varautuneille erikoislaseille, joihin negatiivisesti varautuneet leikkeet kiinnittyvät paremmin. Näyteleikkeitä ei kiinnitetä näytelaseille lämpölevyn avulla, vaan niistä valutetaan ylimääräinen vesi pois ja ne laitetaan yöksi lämpökaappiin (+37 °C). Alhainen kiinnittämislämpötila on hellävarainen kudoksen epitoopeille. Jotta lopputuloksesta saadaan laadukas, on leikkeiden oltava tarpeeksi ohuita, ehjiä ja rypyttömiä. (Naukkarinen 2000, 158; Laasonen 2001, 13; Kirjavainen 2013, 31.)

5.4. Värjäysmenetelmät

Työssä agarsolublokista leikataan yksi ylimääräinen leike hematoksyliini- eosiinivärjäystä varten, jotta voidaan tarkastella näytteen morfologiaa ja laatua. Immunohistokemiallisissa värjäyksissä hematoksyliini toimii tumavärinä. Jotta hematoksyliini- eosiinivärjäys tulee mahdolliseksi ja väriaineet saadaan sitoutumaan näytteeseen, on leikkeestä ensin poistettava veteen liukenematon tukiaine pois. Tämä voidaan tehdä laskevan alkoholisarjan eli rehydraation avulla. (Naukkarinen 2000, 153.)

Hematoksyliini on väriaine, jota saadaan tropiikissa kasvavan *Haematoxylum campechianum*- puun kaarnasta uuttamalla. Väriaineen valtaisa suosio johtuu sen kyvystä osoittaa selkeästi eri kudusrakenteita. (Gample 2008, 121.) Hematoksyliini värjää happamia kudusrakenteita kuten nukleiinihappoja ja jossain määrin myös sytoplasmassa esiintyvää RNA:ta. (Naukkarinen 2000, 153; Mäkinen 2012, 1129.)

Hematoksyliini itsessään ei ole valmis väriaine huonon kudosaaffiniteetin ja värittömyyden vuoksi, mutta hapettamalla se muuttuu väriaineeksi. Hapettaminen voidaan suorittaa antamalla hematoksyliinin olla kosketuksissa ilman ja valon kanssa. Ongelmana kuitenkin tässä luonnollisessa hapetusmuodossa on sen hitaus. (Holliday 2004, 24–25; Gample 2008, 121.) Kemiallinen hapetus on huomattavasti nopeampaa, mutta värin käyttöikä kuitenkin lyhenee. Mayerin hematoksyliini hapetetaan natriumjodaatilla, jol-

loin hematoksyliinistä saadaan väriaine, eli hemateiini. (Couture & Hafer 2004, 24–25; Gamble 2008, 121; Naukkarinen 2006b, 37.)

Hemateiini on hapan aine, joka ei yksin saavuta riittävää affiniteettia eli sitoutumiskykyä happamiin tumanrakenteisiin. Tästä syystä tarvitaan emäksinen peitta-aine, josta käytetään myös englanninkielistä nimitystä mordantti. (Naukkarinen 2000, 153; Couture & Hafer 2004, 24.) Peitta-aineen avulla väri sitoutuu solun tumaan. Maeyrin hematoksyliiniä sanotaan alumiinihematoksyliiniksi, koska sen peitta-aineena toimii alumiini. (Naukkarinen 2000, 153.)

Eosiini on käytetyin vastaväri yhdessä hematoksyliinin kanssa. Eosiinin differentaatio eli diffuus vedessä vaikuttaa näyteleikkeen lopullisen värisävyn intensiteettiin. Eosiini on sytoplasmaväri ja se värjää emäksisiä kudusrakenteita. Se kiinnittyy solunsisäisiin ja ulkoisiin proteiineihin kuten esimerkiksi sidekudokseen ja lihakseen. Eosiinivärjäys on progressiivinen eli näyte ylivärjätään, jonka jälkeen ylivärjäytymä poistetaan pesun avulla. (Couture & Hafer 2004, 24; Naukkarinen 2006b, 40; Gamble 2008, 126.)

6 IMMUNOHISTOKEMIAALLISET VÄRJÄYKSET

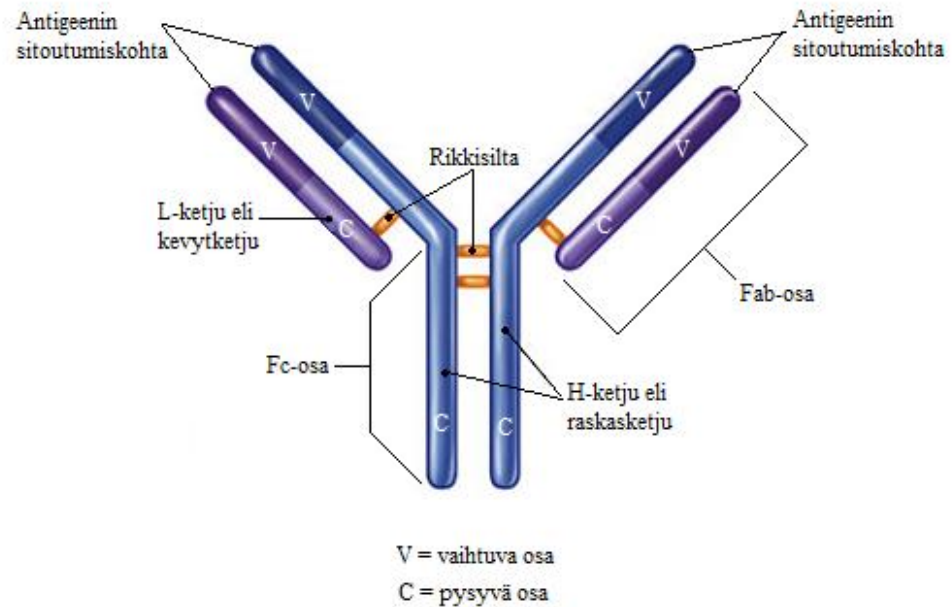
Immunohistokemiaallisia värjäysmenetelmiä on käytetty jo 1970-luvulta asti, mutta niiden käyttö on laajentunut vasta viimeisen kahdenkymmenen vuoden aikana menetelmien ja kaupallisten vasta-aineiden kehittymisen myötä. Värjäysmenetelmiä käytetään kudoksen antigeenien tunnistamiseen erilaisilla spesifisillä vasta-aineilla. Värjäysmenetelmien avulla saatua tietoa käytetään hyväksi kasvainten tunnistamisessa ja luokittelussa. (Mäkinen & Stenbäck 2012a, 1133.)

Immunohistokemiaallisten värjäysten kohteena olevat kudosanantigeenit ovat proteiineja, glykoproteiineja, lipoproteiineja ja pieniä aminohappoketjuja, esimerkiksi solujen kalvorakenteissa. Antigeeni on mikä tahansa rakenne tai molekyyli, joka aiheuttaa sille spesifisen vasta-aineen sitoutumisen itseensä. Epitoppi on antigeenin osa, johon vasta-aineen sitoutumiskohta tarttuu. Sitoutumisvoimakkuus eli affiniteetti vaihtelee eri antigeenien ja vasta-aineiden välillä. (Seppälä 2005, 624; Jackson & Blythe 2008, 435.)

6.1. Vasta-aineet

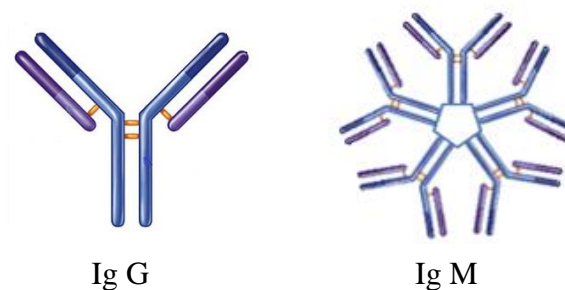
Vasta-aineita eli immunoglobuliineja tuottavat B-lymfosyyteiksi muuntuneet plasmaklorit (Jackson & Blythe 2008, 435). Immunoglobuliinien perusrakenneyksikkö on Y-kirjaimen muotoinen ja se koostuu proteiinirungosta ja siihen liittyneestä pienestä hiilihydraattiosasta (kuva 2). Proteiinirungossa on kaksi keskenään samanlaista H-ketjua ja kaksi keskenään samanlaista L-ketjua. Ketjuja yhdistävät niiden väliset rikkisillat ja ei-kovalenttiset sidokset. Y:n jalka osaa kutsutaan myös Fc-osaksi (Fragment crystallizable) ja sakara osia Fab-osiksi (Fragment – antigen binding). (Seppälä 2005, 626–627.)

Antigeeni sitoutuu vasta-aineen Fab-osiin ja vasta-aine voi sitoutua kahteen samanlaiseen antigeeniin. Fc-osan ja Fab-osien välissä on taipuisa sarana-alue, joka mahdollistaa Fab-osien välisen kulman joustavuuden ja kahden antigeenimolekyylin sitoutumisen yhteen vasta-aine-yksikköön samanaikaisesti, vaikka antigeenimolekyylit sijaitsisivat lähekkäin. Fab-osien päiden rakenne vaihtelee (vaihtuva osa) eri vasta-aineiden välillä ja tämä rakenteen vaihtelu määrää vasta-aineiden antigeeni spesifisyyden. (Seppälä 2005, 626–627.)



KUVA 2. Vasta-aineen rakenne ja rakenneosat (Seppälä 2005, 626–627 muokattu; Nau & Lewis 2008 muokattu)

Immunoglobuliinit luokitellaan rakenteensa mukaan viiteen alaryhmään: IgA, IgG, IgM, IgD ja IgE. Yleisin ja eniten immunohistokemiallisissa värjäyksissä käytetty immunoglobuliini on IgG, joka koostuu yhdestä Y:n muotoisesta perusyksiköstä. Toinen immunohistokemiassa käytetty immunoglobuliiniluokka on IgM, joka koostuu viidestä Y:n muotoisesta perusyksiköstä. (Jackson & Blythe 2008, 435.) Kuvassa 3 on esitetty Ig G- ja Ig M-immunoglobuliinien kaavakuvat.



KUVA 3. Ig G- ja Ig M-immunoglobuliinien rakenne (Jackson & Blythe 2008, 435 muokattu; Nau & Lewis 2008 muokattu)

6.2. Polyklonaaliset ja monoklonaaliset vasta-aineet

Vasta-aineet jaetaan polyklonaalisiin ja monoklonaalisiin vasta-aineisiin. Polyklonaaliset vasta-aineet pystyvät sitoutumaan saman antigeenin eri epitooppeihin eli polyklonaalinen vasta-aine on seos erilaisia vasta-aineita. Tämä ominaisuus johtuu polyklonaalisten vasta-aineiden valmistustavasta, jossa koe-eläimeen ruiskutetaan puhdistettua antigeeniä ja koe-eläimen elimistö tuottaa vasta-aineita tätä antigeeniä kohtaan. Syntyneet vasta-aineet puhdistetaan koe-eläimen seerumista käyttöä varten. Polyklonaalisen vasta-aineen affiniteetti ja spesifisyys vaihtelevat erilaisten sitoutumiskohtien takia ja tämä voi aiheuttaa epäspesifistä värjäytymistä. (Rantala & Laasonen 2000, 148; Jackson & Blythe 2008, 436.)

Monoklonaaliset vasta-aineet ovat yhden solukloonin tuottamia ja siten samanlaisia keskenään. Ne sitoutuvat vain yhteen epitooppiin tietyssä antigeenissa ja niiden affiniteetti on samanlainen. Monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamiseen käytetään vuonna 1975 kehitettyä hybridomatekniikkaa. Tekniikassa yhdistetään spesifistä vasta-ainetta tuottava plasm solu ja jatkuvan jakautumiskyvyn omaava neoplastinen myelomasolu. Näin syntynyt solu tuottaa teoriassa rajattomasti haluttua vasta-ainetta in vitro – olosuhteissa. Tämän tekniikan kehittäminen laajensi huomattavasti saatavilla olevien vasta-aineiden määrää, paransi niiden laatua ja laski niiden hintaa. Monoklonaalisten vasta-aineiden spesifisyyden takia värjäystulos on tarkka. Spesifisyys myös rajoittaa käytettävissä olevien epitooppien määrää ja aiheuttaa niukemman värjäytymisen verrattuna polyklonaaliseen vasta-aineeseen. (Rantala & Laasonen 2000, 148; Jackson & Blythe 2008, 436.)

6.3. Näytteiden esikäsittely immunohistokemiassa

Ennen immunohistokemiallisia värjäyksiä näytteet käyvät läpi edellisissä luvuissa kerrotun histologisen näytteiden käsittelyprosessin. Lämpökaapissa yön yli olleille näytelaseille suoritetaan ensimmäiseksi parafiinin poisto laskevan alkoholisarjan avulla. (Naukarinen 2000, 158; Laasonen 2001, 13.)

Formaliinifiksaatiosta johtuvien ristsidoksien takia näytteille suoritetaan esikäsittely antigeenien paljastamiseksi. Eri antigeeneille on määritelty omat optimaaliset esikäsitte-

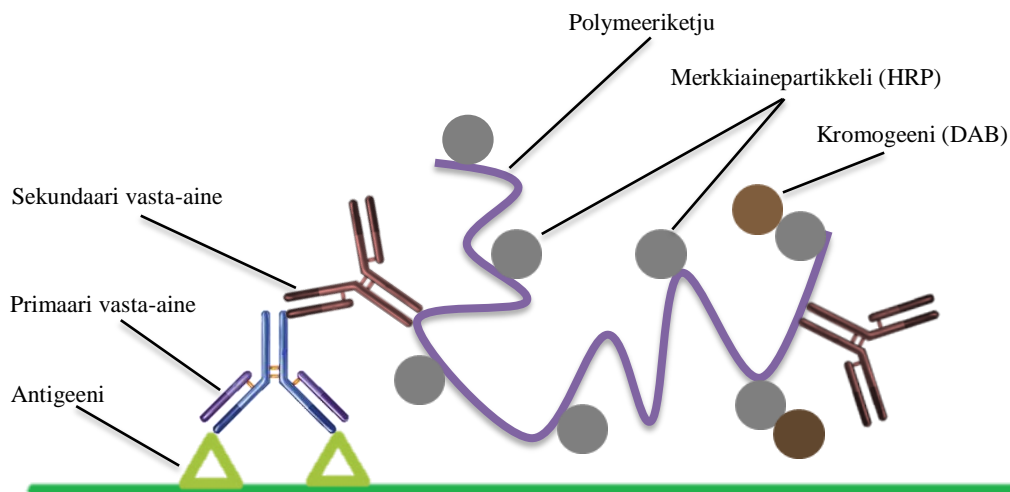
lymenetelmät vasta-aineen valmistajan ja laboratorioiden omien testausten mukaan. Esikäsitteilyyn voidaan käyttää korkeaa lämpötilaa, entsyymikäsitteilyä tai näiden yhdistelmää. (Rantala & Laasonen 2000, 151.)

Työssä esikäsitteily tapahtuu korkeassa lämpötilassa, joka toteutetaan mikroaaltouunin avulla. Menetelmässä puskuroidussa esikäsitteilyliuoksessa olevia näytelaseja kuumentaan kiehumispisteeseen tietyn optimoidun ohjelman mukaan. Esikäsitteilyliuoksina käytetään sitraattipuskuria, jonka pH on 6, tai EDTA-puskuria, jonka pH on 9. Esikäsitteilyssä tärkeitä tekijöitä ovat pH, käsitteilyaika ja lämpötila. Menetelmän ongelmina ovat proteiinien denaturoituminen eli niiden rakenteen muuttuminen liiallisen kuumentamisen takia sekä leikkeiden irtoaminen lasilta. (Rantala & Laasonen 2000, 151; Jackson & Blythe 2008, 442–445; Kumar & Rudbeck 2009, 51–52.)

6.4. Immunohistokemialliset värjäysmenetelmät

Yksinkertaisin immunohistokemiallinen värjäysmenetelmä on suora menetelmä, joka on nopea, mutta ei tarpeeksi herkkä määrittämisiksi varten. Suorassa menetelmässä tiivistyy immunohistokemiallisten värjäysten peruseriaate. Siinä käytetään yhtä antigeenispesifistä primaarivasta-ainetta, joka on leimattu halutulla merkkiaineella. Merkkiaine on kiinnittynyt primaarivasta-aineen Fc-osaan. Tämä primaarivasta-aine sitoutuu suoraan tutkittavaan antigeeniin ja värjäystulos osoitetaan merkkiaineen osoitusreaktiolla. (Rantala & Laasonen 2000, 148.)

Kehityksen tuloksena on syntynyt paljon herkempiä epäsuoria värjäysmenetelmiä, joissa käytetään primaarivasta-aineen lisäksi sekundaarivasta-ainetta, joka tarttuu primaarivasta-aineen Fc-osaan. Lisäksi kehityksen tavoitteena on ollut värjäystuloksen voimistaminen lisäämällä sekundaarivasta-aineeseen sitoutuneen merkkiaineen määrää. Työssä käytetään nykyään laajalti käytössä olevaa polymeerimenetelmää (kuva 4). Siinä sekundaarivasta-aineeseen on sitoutunut pitkä polymeeriketju, johon on sitoutunut useita merkkiainepartikkeleita. Tämän menetelmän ongelmana on ollut se, että isokokoinen polymeeri vaikeuttaa vasta-aineen pääsyä antigeenin luokse, mutta tämän ongelman ratkaisemiseksi on kehitetty pienempiä polymeerejä. (Jackson & Blythe 2008, 438–440; Key 2009, 57–59.)



KUVA 4. Epäsuora polymeeritekniikka (Nau & Lewis 2008 muokattu; Key 2009, 59 muokattu)

Vasta-aineen tarttuminen antigeeniin saadaan valomikroskoopissa näkyväksi reaktioksi vasta-aineeseen liitetyn merkkiaineen ja sen kanssa reagoivan kromogeenin avulla. Merkkiaine ei saa vaikuttaa negatiivisesti vasta-aineen sitoutumiseen ja sen pitää pysyä kiinni vasta-aineessa. Työssä käytetään yleistä merkkientsyymiä piparjuuri peroksidaasia (HRP), jonka substraattina toimii vetyperoksidi. Piparjuuri peroksidaasi reagoi substraattinsa ja kromogeenina käytetyn 3,3'-diaminobentsiinitetrahydrokloridin (DAB) kanssa muodostaen näkyvän tumman ruskean sakan. DAB on karsinogeeni eli syöpää aiheuttava aine, mikä tulee ottaa huomioon työskentelyssä. (Rantala & Laasonen 2000, 149; Boenisch 2009, 16–17.)

Merkkiaineen ja kromogeenin reaktio on immunohistokemiallisen värjäyksen viimeinen vaihe. Tämän jälkeen näytteet värjätään vielä Mayerin hematoksyliinillä, joka luo kontrastin näytteen mikroskopoinnin helpottamiseksi. Hematoksyliinivärjäyksen jälkeen lasit kulkevat nousevan alkoholisarjan kautta ksyleeniin, jolloin lopputulos kirkastuu. Lopuksi lasit päällystetään peitinlaseilla. (KSSH 2012b.)

6.5. Taustavärjäytyminen

Yksi yleisin värjäystuloksen tulkintaa vaikeuttava asia on taustavärjäytyminen. Sitä aiheuttavat monet näytteestä ja sen esikäsittelystä johtuvat ominaisuudet sekä värjäykses-

sä käytettävä merkkiaine (taulukko 3). Taustavärjäytyminen jaetaan spesifiseen ja epäspesifiseen taustavärjäytymiseen. (Rantala & Laasonen 2000, 151–152; Jackson & Blythe 2008, 452–453; Wendelboe & Bisgaard 2009, 115–121.)

TAULUKKO 3. Taustavärjäytymistä aiheuttavat tekijät (Rantala & Laasonen 2000, 151–152; Rantala 2001, 22; Wendelboe & Bisgaard 2009, 115–121.)

Spesifinen tausta	Epäspesifinen tausta	Merkkiaineen aiheuttama tausta
Näytteen puristuminen	Vasta-aineiden epäspesifisyys	Endogeeninen peroksidaasi
Näytteen kuivuminen	Väärät laimennokset	
Hidas fiksaatio	Proteiinien väliset reaktiot	
Autolyysi	Epäspesifiset sitoutumiskohdat	
Nekroosi	Hydrofobisuus	
Makrofagit	Elektrostaattiset voimat	

Spesifisessä taustavärjäytymisessä värjäytyy tutkittava antigeeni, joka on päässyt difuntoitumaan ympäröivään näytemateriaaliin näytteen vaurioitumisen seurauksena. Näytteen vaurioitumista aiheuttaa esimerkiksi autolyysi. Spesifistä taustavärjäytymistä aiheuttaa myös makrofagit, jotka ovat fagosytoineet antigeeniä. (Rantala & Laasonen 2000, 151–152; Jackson & Blythe 2008, 452–453; Wendelboe & Bisgaard 2009, 115–121.)

Epäspesifisessä taustavärjäytymisessä vasta-ainetta sitoutuu epäspesifisiin proteiineihin hydrofobisuuden tai elektrostaattisten voimien takia. Fiksaatio lisää näytteen hydrofobisuutta. Elektrostaattisten voimien vaikutuksen vähentämiseksi voidaan käyttää BSA-liuosta (bovine serum albumin) tai kaseiinia epäspesifisten sitoutumiskohtien blokkamiseen. Hydrofobisuuden vähentämiseen käytetään pintajännitystä alentavaa Tween 20-liuosta pesu- ja laimennospuskurissa. Epäspesifistä taustavärjäytymistä aiheuttaa myös vasta-aineiden epäspesifisyys, jota esiintyy käytettäessä polyklonaalisia vasta-aineita. (Rantala & Laasonen 2000, 151–152; Rantala 2001, 22; Jackson & Blythe 2008, 452–453; Wendelboe & Bisgaard 2009, 115–121.)

Kromogeenina käytetty DAB saattaa aiheuttaa taustavärjäytymistä reagoidessa näytteen oman endogeenisen peroksidaasin kanssa. Reaktion seurauksena näytteeseen muodostuu samaa tumman ruskeaa väriä kuin DAB:n reagoidessa merkkiaineena käytetyn pi-parjuuri peroksidaasin kanssa. Endogeenista peroksidaasia esiintyy runsaasti kaikissa hemoproteiineissa, kuten esimerkiksi hemoglobiinissa, lihassoluissa ja makrofageissa. Reaktio endogeenisen peroksidaasin kanssa pyritään estämään inkuboimalla näytteitä 3-prosenttisessa vetyperoksidiliuoksessa ennen värjäystä. (Rantala & Laasonen 2000, 151–152; Wendelboe & Bisgaard 2009, 115–121.)

6.6. Käytetyt kontrollit ja värjäystuloksen tulkita

Immunohistokemiallisissa värjäyksissä käytetään kontrolleja varmistamaan esikäsittelyn onnistuminen ja reagenssien toimivuus. Kontrollit jaetaan positiivisiin kuduskontrolleihin ja negatiivisiin menetelmäkontrolleihin. Positiivisina kuduskontrolleina työssä käytetään jokaiselle vasta-aineelle valmiina olevia kudusblokkeja, joiden tiedetään antavan positiivisen reaktion kyseisellä vasta-aineella. Kuduskontrolliblokeista leikataan leikkeet samalle lasille näytteen kanssa ja ne käyvät läpi saman käsittelyn kuin näyte. (Rantala & Laasonen 2000, 151–152; Rasmussen 2009, 127–130.) Työssä käytetyille sytologisille näytteille ei ole olemassa omia positiivisia kontrolleja, vaan niille käytetään samoja kontrolleja kuin histologisille näytteille.

Menetelmäkontrollina työssä käytetään yhtä ylimääräistä näytelasia, jonka kohdalla värjäyksessä jätetään primaarivasta-aine pois ja tilalla käytetään pelkkää vasta-aineen laimentamiseen käytettyä puskuria. Muuten menetelmäkontrollina käytetty näyte käy läpi saman käsittelyn kuin muut näytteet. Negatiivisella menetelmäkontrollilla varmistetaan, että värjäyksessä käytettävät muut aineet eivät aiheuta epäspesifistä värjäytymistä. (Rantala & Laasonen 2000, 151–152; Rasmussen 2009, 127–130.)

Näytelasien värjäytymistä tulkittaessa otetaan aina huomioon kontrollien värjäytyminen. Taustavärjäytymistä arvioidaan negatiivisesta menetelmäkontrollista, koska siitä puuttuu primäärisen vasta-aineen aiheuttama spesifinen värjäytyminen. Negatiivista tulosta arvioidessa pitää ottaa huomioon antigeenien epitooppien tuhoutuminen käsittelyn aikana, näytteen riittävä määrä ja laatu. Positiivisten tulosten kohdalla pitää ottaa huomioon myös väärän positiivisuuden mahdollisuus. Luotettavassa positiivisessa tu-

loksessa väri on rajautunut selkeästi ja tarpeeksi voimakkaasti yhteen, sille oikeaan paikkaan. Lisäksi taustavärjäytyminen on vähäistä ja kontrollit ovat värjäytyneet hyvin. (Hladik & White 2008, 481–488.)

7 NÄYTTEISTÄ PAIKANNETUT ANTIGEENIT

Työssä näytteistä paikannetaan sytokeratiini 7 (CK7)-, sytokeratiini 20 (CK20)-, kalretiniini- ja thyroid transcription factor-1 (TTF-1) -antigeenit niille spesifisillä vasta-aineilla. Alla olevassa taulukossa (taulukko 4) on esitetty näiden antigeenien ilmentyminen pleura- ja askitesnäytteissä esiintyvissä syöpätyypeissä. Antigeenejä käytetään erilaisten karsinoomien tyypityksessä ja metastaasien alkuperän määrittämisessä sekä adenokarsinooman ja mesoteliooman erottamisessa toisistaan. (Aho 2005; NordiQC 2011.) Antigeenien ilmentymisessä syöpätyypeittäin löytyy aina poikkeuksia, kuten taulukostakin ilmenee CK7 ja kalretiniinin kohdalla (Pirinen ym. 2012, 549).

TAULUKKO 4. Paikannettujen antigeenien ilmentyminen keuhkosityöpätyypeissä (Pirinen ym. 2012, 549 muokattu)

Keuhkosityöpätyyppi	TTF-1	CK7	CK20
Adenokarsinooma	+	+	-
Levyepiteelikarsinooma	-	- / +	-
Musinoottinen adenokarsinooma	-	+	+

7.1. Sytokeratiini 7 ja 20

Solujen tukirangan välikokoisten säikeiden proteiineja eli sytokeratiineja käytetään erilaisten karsinoomien diagnosoimiseen. Sytokeratiinit numeroidaan niiden molekyyli-painon mukaan ja niitä on happamia ja emäksisiä. (Dabbs 2006, 183–184.) Sytokeratiini 7:ää (CK7) esiintyy munasarjoissa, keuhkoissa ja rintakudoksessa, mutta ei paksusuolella, eturauhasessa tai ruuansulatuskanavassa (Thermo Scientific 2010). CK20:tä esiintyy taas ruuansulatuskanavan ja suolen epiteelisoluissa (Thermo Scientific 2011b). CK 7:ää ja CK 20:tä käytetään erilaisten esiintyvyyksiensä takia yhdessä karsinoomien tyypitykseen ja metastaasien alkuperän määrittämiseen. Taulukossa 5 on esimerkkejä siitä, miten CK 7 ja CK 20 positiivisuutta ilmenee eri tapauksissa. (Aho 2005; NordiQC 2012.)

TAULUKKO 5. CK 7 ja 20 yhteiskäyttö karsinoomien tyypityksessä ja metastaasien sijainnin määrittämisessä (Aho 2005; NordiQC 2012)

CK 7 + ja CK 20 +
<ul style="list-style-type: none"> - Uroteelin (välimuotoisen epiteelin) karsinooma - Haimakarsinooma (CK7 + 91%, CK20 + 43%) - Kolangiokarsinooma (CK7 + 94%, CK20 + 47%, sappiteiden karsinooma) - Munasarjan musinoottinen karsinooma - Maha- ja sappitiekarsinoomassa - (Merkelin solujen karsinooma, 20% tapauksista)
CK 7 + ja CK 20 –
<ul style="list-style-type: none"> - Keuhko-, rinta-, endometrium- ja kilpirauhasperäiset adenokarsinoomat - Ei-musinoottinen munasarjan adenokarsinooma - Munasarjan seroosi karsinooma - Epiteliaalinen mesoteliooma - Haimakarsinooma (CK7 + 91%, CK20 + 43%) - Kolangiokarsinooma (CK7 + 94%, CK20 + 47%, sappiteiden karsinooma) - Tymooma (Kateenkorvan kasvain) - Kordooma (Selkärangassa ja kallonpohjassa esiintyvä harvinainen luukasvain) - Synoviaalisarkooma (Nivelpussin sisäkerroksen solusta lähtöisin oleva sarkooma)
CK 7 – ja CK 20 +
<ul style="list-style-type: none"> - Kolorektaalinen adenokarsinooma (paksusuolen ja peräsuolen syöpä) - Merkelin solujen karsinooma (tiettyjen solujen ihosyöpä)
CK 7 – ja CK 20 –
<ul style="list-style-type: none"> - Hepatosellulaarinen karsinooma (maksasolujen karsinooma) - Munuaisen kirkassoluinen karsinooma (lisämunuaiskuoren karsinooma ja munuaissolukarsinooma) - Eturauhasen adenokarsinooma - Levyepiteelikarsinooma - Pienisolukarsinooma

7.2. Kalretiniini

Solun sisäistä kalsiumia sitovaa proteiinia, kalretiniinia, esiintyy useimmissa epiteeliaalisissa pahanlaatuisissa mesotelioomissa ja pienessä osassa keuhkoperäisiä adenokarsinomia. Värjäytyvyys esiintyy pääosin sytoplasmassa ja osittain tumassa. Kalretiniinia käytetään malignien mesoteliomien erottamiseen karsinoomista. (Thermo Scientific 2011a, NordiQC 2011.)

7.3. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1)

Transcription factors eli transkriptiotekijät ovat joukko proteiineja, jotka voivat stimuloida tai estää tietyn geenin transkription sitoutumalla niiden säätelyalueelle. Ne esiintyvät solun tumassa lähellä DNA:ta, jonka vuoksi värjäytyvyys havaitaan tumassa. TTF-1 tunnistettiin ensimmäisen kerran kilpirauhaselle spesifiseksi, mutta sen jälkeen sitä havaittiin myös muilla alueilla, esimerkiksi keuhkoissa ja aivolisäkkeessä. TTF-1:stä käytetään keuhkoperäisten adenokarsinomien ja neuroendokriinisten maligniteettien havaitsemiseen. Epiteeliaalisissa ja sekatyypisissä mesotelioomissa TTF-1 on negatiivinen. (NordiQC 2009.)

8 TYÖN TARKOITUS JA TUTKIMUSKYSYMYKSET

Opinnäytetyön tarkoituksena on tutkia agarsolublokkimenetelmällä valmistettujen näytteiden immunohistokemiallista värjäytyvyyttä vertaamalla niitä käytössä olevalla solublokkimenetelmällä valmistettuihin näytteisiin. Työn näytemateriaalina käytetään pleura- ja askitesnäytteitä. Tavoitteena on saada entistä suurempi solumäärä talteen niukasta materiaalista sitomalla solut agariin ja estää solujen hävikki entistä tehokkaammin. Lisäksi työssä tarkastellaan alkoholifiksaatioajan vaikutusta lopulliseen värjäytyvyyteen.

Tutkimuskysymykset:

1. Miten solublokki- ja agarsolublokkimenetelmien immunohistokemiallisten värjäysten tulokset eroavat toisistaan?
2. Miten alkoholifiksoitujen näytteiden säilytysaika vaikuttaa immunohistokemiallisten värjäysten tuloksiin?

9 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Opinnäytetyössä käytetään tutkimusstrategiana kvalitatiivista vertailevaa tutkimusta, jossa keskitytään kuvaamaan tiettyjen menetelmien välisiä eroavuuksia ja yhtäläisyyksiä. Vertaileva tutkimus voi olla teoriaa testaava, kehittävä tai kuvaileva tutkimus. Opinnäytetyö on tavoitteeltaan kuvaileva tutkimus, jossa esitetään tarkka kuvaus tapahtumista ja dokumentoidaan ilmiöiden keskeisiä piirteitä. (Saukkonen 2006; Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 138–139; Menetelmäpolku 2012.)

Työssä käytetään kvalitatiivista menetelmäsuuntausta, koska työssä arvioidaan immuunohistokemiallisten värjäystulosten laatua (Menetelmäpolku 2012). Työssä on myös kvantitatiivisen eli määrällisen tutkimuksen piirteitä, koska koejärjestelyt ovat ennalta suunniteltuja ja tuloksien laadullisen arvioinnin havainnollistamisessa käytetään taulukointia (Hirsjärvi ym. 2009, 139–140).

10 TYÖN EETTISYYS

Opinnäytetyötä tekevien opiskelijoiden on hyvä pitää mielessä tutkimustyön eettisyys jo työtä suunniteltaessa ja tulevaa tutkimusaihetta valittaessa. Erityistä huomiota täytyy kiinnittää tutkimuksen kohteena olevien henkilöiden, henkilötietojen ja näytetietojen käsittelyyn sekä rehellisyyteen tutkimuksen kaikissa vaiheissa. Rehelliseen toimintatapaan kuuluu lähdetietojen ja lainauksien merkitseminen, toisten tutkijoiden osuuden huomioiminen, menetelmien tarkka kuvaaminen sekä tulosten kriittinen tarkastelu. (Hirsjärvi ym. 2009, 23–27.)

Opinnäytetyö aloitettiin kirjallisen suunnitelman laatimisella ja työlle haettiin tutkimuslupa. Työssä käytettiin rutiinista diagnostiikasta jäljelle jääneitä näytteitä eikä työtä varten kerätty ylimääräisiä näytteitä potilailta. Siksi erillistä lupaa potilailta ei tarvittu näytteiden käyttämiseen. Työtä varten potilasnäytteiden näytenumerot muutettiin juoksevaksi numeroinniksi 1-10. Näin näytteitä ei pysty yhdistämään potilastietoihin. Potilastietoja sisältävän materiaalin oikeaoppisesta käsittelystä huolehdittiin työskentelyn aikana Keski-Suomen sairaanhoitopiirin tietosuojaperiaatteita noudattaen (Tietosuojaja 2012).

11 TYÖN LUOTETTAVUUS

Työn luotettavuutta arvioidaan reabiliteetin ja validiteetin avulla. Reliabiliteetilla tarkoitetaan tulosten toistettavuutta joko eri tutkimuksissa tai eri ihmisten toimesta. Validiteetti tarkoittaa sitä, vastaako tutkimustulokset esitettyihin tutkimuskysymyksiin. (Hirsjärvi ym. 2009, 231–233.)

Työn reliabiliteettia ja validiteettia lisää toteutuksen suunnittelu yhdessä patologian laboratorion henkilökunnan kanssa hyödyntämällä heidän ammattitaitoaan. Lisäksi suunnittelussa apuna käytettiin aiempia tutkimustuloksia ja patologian laboratorion käytössä olevia työohjeita. Agarsolublokinäytteet käsiteltiin samalla tavalla potilasnäytteiden kanssa, mikä lisää myös työn reliabiliteettiä ja validiteettia.

Työn näytemäärän, kuusi pleura- ja neljä askitesnäytettä, määräsi sairaalassa otettujen pleura- ja askitesnäytteiden määrä. Mikroskopoitavia laseja 10 näytteestä tuli yhteensä 100 kappaletta. Näytemäärän kasvattaminen lisäisi työn luotettavuutta, mutta työllistäisi patologian laboratorion henkilökuntaa ja opinnäytetyön tekijöitä enemmän. Kymmenen näytteen käsittelemisen ja mikroskopoinnin aiheuttama työmäärä oli sopiva yhteen opinnäytetyöhön. Työn tulokset ovat yhtenäisiä aiempien tutkimuksien kanssa ja siksi työ voidaan todeta validiksi.

12 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

Työn empiirinen osuus suoritettiin Keski-Suomen Keskussairaalan patologian laboratoriossa maaliskuussa 2012, viikolla 12 ja osittain viikolla 13. Opinnäytetyön suunnitelma hyväksyttiin helmikuussa 2012 ja ylilääkäri Teijo Kuopio myönsi sille tutkimusluvan ajalle 26.3.2012 – 31.5.2013.

Tutkimusmateriaalina käytettiin potilasnäytteitä, joista oli tehty patologisanatomista diagnoosia varten (PAD) tarvittavat tutkimukset. Henkilökunta keräsi tähän työhön ylimääräistä näytemateriaalia talteen 19.1- 26.3. välisenä aikana. Näytteet olivat sisältäneet havaittuja solukappaleita ja niistä oli valmistettu etukäteen solublokkivalmiste.

Aluksi kerättyjä pleura- ja askitesnäytteitä oli yhteensä 6 kappaletta. Näytteitä saatiin käytännön työskentelyn aikana kaksi kappaletta lisää ja myöhemmin henkilökunnan valmistamana näytemäärä kasvoi vielä kahdella kappaleella. Työn empiirisen osuuden aikana pleura- ja askitesnäytteitä ei saapunut tuoreena patologian laboratorioon. Yhteensä näytteitä oli 10 kappaletta, 6 pleura- ja 4 askitesnäytettä.

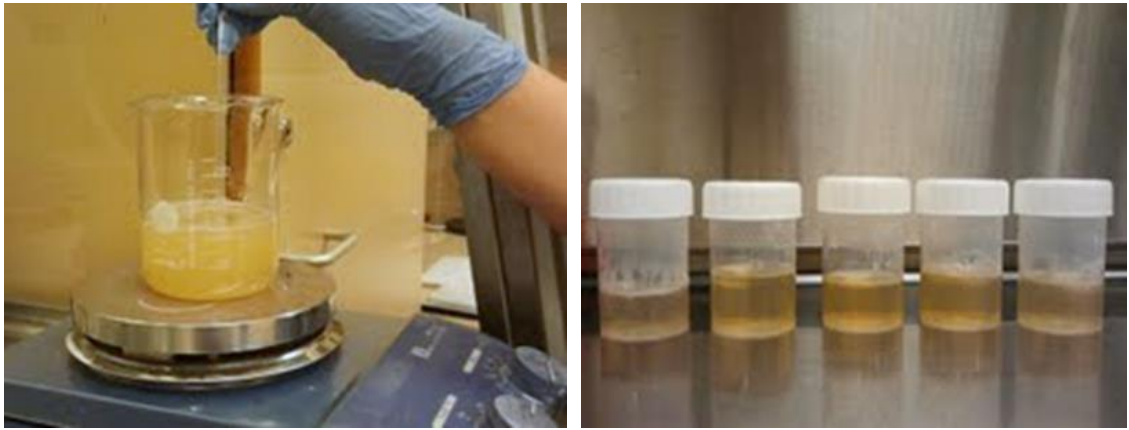
Näytteiden esitiedot koottiin taulukkoon (taulukko 6). Näytteistä valmistettiin agarsolublokki mukailemalla Marian sairaalan agarsoluvalmisteohjetta ja histologinen sekä immunohistokemiallinen näytteenkäsittelyprosessi suoritettiin Keski- Suomen keskussairaalan omien työohjeiden mukaisesti.

TAULUKKO 6. Näytteiden esitiedot ja fiksoitumisaika

Näyte- numero	Näyte- muoto	Saapunut	Agarsolu- blokki	Fiksoitu- misaika (pv)	Tietoja näytteestä
1	Askites	26.3.	28.3.	2	Metastoitunut adenokarsinooma
2	Pleura	23.3.	28.3.	6	Metastoitunut adenokarsinooma
3	Askites	11.3.	27.3.	16	Adenokarsinooma
4	Askites	6.3.	27.3.	21	Kystadeno- karsinooma
5	Pleura	14.2.	27.3.	43	Epäilty adenokarsinooma
6	Pleura	9.2.	27.3.	47	Metastoitunut adenokarsinooma
7	Pleura	2.2.	27.3.	54	Malignisuspekti
8	Pleura	19.1.	27.3.	69	Ei soluatypiaa
9	Askites	11.4.	—*	—*	Epäilty haimakarsinooma
10	Pleura	13.4.	—*	—*	Epäilty duktaalisen rintakarsinooman- metastaasi

*Ei tiedossa

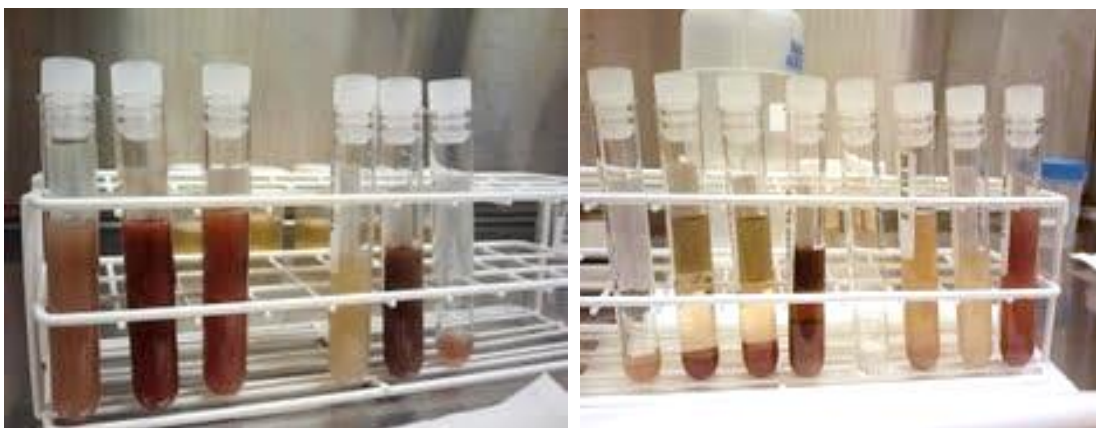
Käytännön työskentely aloitettiin agarseoksen valmistamisella. Laboratoriossa työskentely tapahtui itsenäisesti opinnäytetyön ohjaajien avustuksella. Toiminnassa huomioitiin steriili toimintatapa kontaminaation välttämiseksi. Agarseosta valmistettiin työohjeen mukaisesti kaksinkertainen annos sekoittamalla 4 g:a agarjauhetta 100 ml: an UHP-vettä. Agarseos kuumennettiin lämpölevyllä lasisauvalla sekoittaen. Liuennot seos kaadettiin viiteen muoviseen purkkiin ja seoksen annettiin jäähtyä korkit avoinna. Seos oli juoksevaa noin 50-70 °C:ssa, mutta jäähmettyi alle 45 °C:ssa (kuva 5).



KUVA 5. Agarin valmistaminen (Kuva: Elina Virkkunen 2012)

Seuraavaksi askites- ja pleuranäytteille identifioitiin omat putket. Näytteiden käsittelyyn kiinnitettiin erityistä huomiota, jotta näytteet eivät sekoittuisi keskenään. Putket olivat muovisia ja pyöreäpohjaisia, jotta lopullisen näytemateriaalin irrottaminen putkesta onnistuisi mahdollisimman helposti rikkomatta sitä liikaa. Näytteet poikkesivat toisistaan niitä silmämääräisesti tarkastellessa. Toiset olivat verisiä ja sakeita, kun taas toiset näytteistä olivat kirkkaampia ja kellertäviä. Näytemäärät olivat myös poikkeavia, sillä osa näytteistä oli todella niukkoja, mutta siitä huolimatta kaikki näytteet käsiteltiin. Näytettä kaadettiin putkeen korkeintaan sen puoleen väliin asti. Jos näyte oli kovin sakea, sekaan laitettiin hieman 50-prosenttista alkoholia.

Tämän jälkeen näyteputket sentrifugoitiin Eppendorf Centrifuge 5702 –sentrifugilla laboratorion solublokki-ohjeen mukaisesti 5 minuuttia 4000 rpm. Sentrifugointiohjelman päätyttyä putket nostettiin varovasti sentrifugista, jotta keskipakovoiman avulla pohjaan painunut solupelletti ei rikkoutuisi. Supernatantti imettiin pinnalta pois pasteuripipetin avulla (kuva 6).



KUVA 6. Näytteet ennen ja jälkeen sentrifugoinnin (Kuva: Elina Virkkunen 2012)

Valmista jähmettynyttä ja jäähtynyttä agarseosta sulatettiin pieni määrä kerrallaan juoksevampaan muotoon mikroaaltouunissa noin 15 sekunnin ajan 30 °C:ssa. Seos kuumentui nopeasti, joten oli varottava ylikiehumista. Työohjeen mukaan liian kuuma agar-seos häiritsee immunohistokemiallisia värjäyksiä, koska liika kuumuus tuhoaa vasta-aineiden kiinnittymiskohtia eli epitooppeja. Ennen agarin lisäämistä näytteeseen varmistettiin, että seos on hieman jäähtynyttä.

Putkessa olevan solumateriaalin päälle lisättiin 4-5 tippaa agaria ja solususpensiota sekoitettiin pasteur-pipetin avulla. Agarseos jähmettyi nopeasti, joten työskentelyn tuli tapahtua ripeästi. Agarseosta voitiin lämmittää tarvittaessa uudelleen. Jos näyte oli paksu tai verinen, agaria lisättiin reilummin.

Agarseoksen sekoittamisen jälkeen näyteputket siirrettiin jääkaappiin viilentymään. Suositus oli, että putket ovat jääkaapissa vähintään 30 minuutin ajan. Tässä työssä putket olivat kylmässä 60 minuuttia. Kylmäkäsittelyn jälkeen jähmettynyt agarsolunappi pyrittiin saamaan putkesta pois putkesta mahdollisimman ehjänä. Pasteur-pipettiä käytettiin apuna agarsolunapin irrotuksessa. Pipetin avulla saatiin putken pohjalle ilmaa, jolloin nappi irtosi putkesta helpommin. Paksuihin ja runsaisiin agarsolunappeihin tehtiin aluksi viilto putkessa ja poistettiin sitten pinsettien avulla. Nappi poistettiin putkesta naputtelemalla sitä pöydän päällä olevan sellun päälle tai suoraan näyteketin päälle.

Agarsolunappi leikattiin noin 2-3 millimetrin paksuisiksi siivuiksi kertakäyttöteräällä veitsellä pinsettejä apuna käyttäen. Ohut solunappi laitettiin kokonaisena näyteketiin. Koska näytemateriaali voi esiintyä runsaampana putken pohjalla sentrifugoinnin vuoksi, näytesivut leikattiin ylhäältä alaspäin, jotta näytteen kokonaisvaltainen koostumus tulisi paremmin esille (kuva 7).



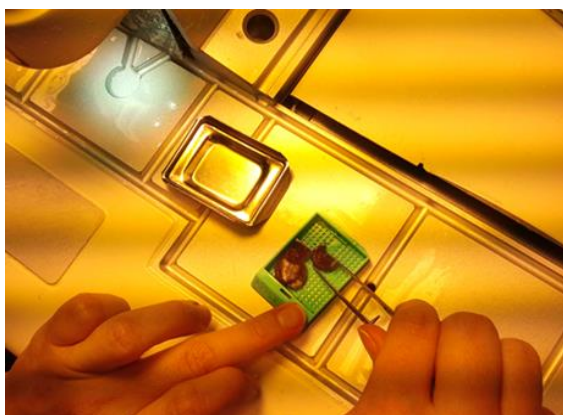
KUVA 7. Siivutettu agarnappi näyteketissa (Kuva: Elina Virkkunen 2012)

Eri näytteiden välillä metallisia välineitä käytettiin alkoholissa (50 %) keskinäisen kontaminaation ehkäisemiseksi. Näytesivut aseteltiin leikkauspinta alaspäin näytekasetille. Suljetut ja identifioidut näytekasetit siirrettiin formaliinia sisältävään purkkeihin, jotta näytemateriaali säilyisi eikä pääsisi kuivumaan (kuva 8). Solublokit laitettiin yöksi automaattiseen ThermoScientific Exelsior ES -kudoskuljetusautomaattiin.



KUVA 8. Valmiit näytekasetit formaliinissa (Kuva: Elina Virkkunen 2012)

Seuraavana aamuna parafiiniblokkien valmistaminen aloitettiin henkilökunnan ohjeiden mukaan. Valaminen tapahtui ThermoScientific Microm EC 350-2 -laitteella, jossa sulaa parafiini valutettiin näytteen ympärille. Kasetin kansi poistettiin ja näytemateriaali siirrettiin leikkauspinta alaspäin valumuottiin. Parafiiniä valutettiin automaattista näytteen päälle ja näytekasetin pohja siirrettiin valumuotin päälle. Kun näyteblokki jäähdytti, se irtosi helposti valumuotista (kuva 9). Lopuksi ylimääräiset parafiinikappaleet poistettiin kasetin reunoilta lämpölevyn avulla.

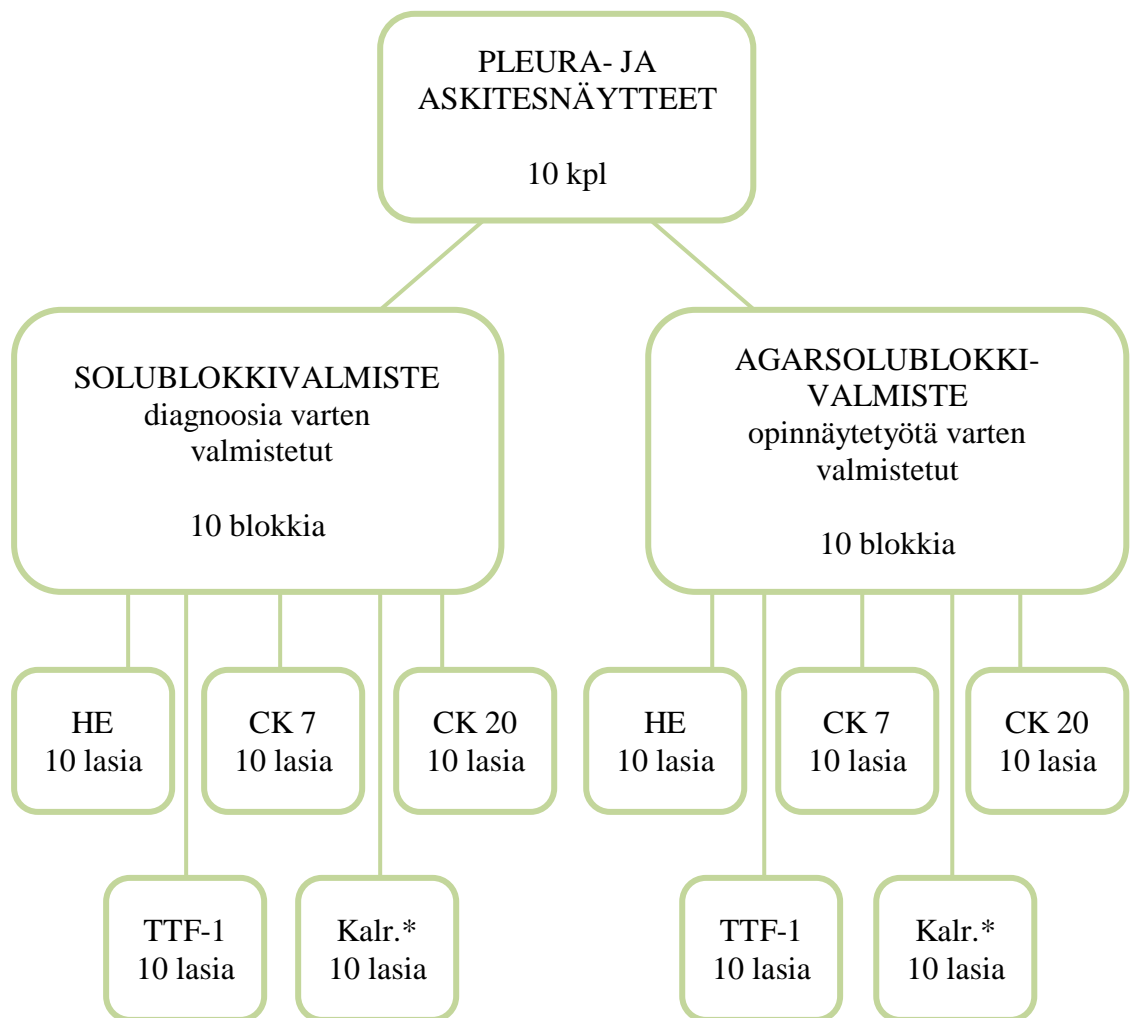


KUVA 9. Parafiiniin valetut näyteblokit (Kuva: Elina Virkkunen 2012)

Laboratorion henkilökunta suoritti blokkien leikkaamisen mikrotomilla muun työskentelyn ohessa. Näin työtä varten saatiin laadukkaat leikkeet ja näytelasit. Jokaisesta agarsolublokista leikattiin yhdeksän näytelasin sarja. Jokaiseen sarjaan lisättiin positiivinen kontrollileike laboratorion positiivisista kontrolliblokeista. Yksi näytelasi värjättiin hematoksyliini-eosiinivärjäyksellä. Neljää lasia käytettiin immunohistokemiallisissa värjäyksissä (sytkeratiini 7, sytkeratiini 20, kalretiniini ja TTF-1) ja neljä lasia jäi varalle. Lasit leikanneen laboratoriohoitajan mielestä leikkaaminen sujui ongelmitta, eikä agarsolublokkien leikattavuudessa ollut eroja.

Näytteistä aiemmin tehdyt solublokkivalmisteet ja niistä värjätyt näytelasit haettiin varastosta. Solublokeista leikattiin näytelaseja huomioiden, mitä värjäyksiä näytteelle oli aikaisemmin jo tehty.

Immunohistokemialliseen värjäykseen menevät leikkeet siirrettiin positiivisesti varautuneille SuperFrost-laseille, jotka pitävät näytteen paremmin lasilla käsittelyjen aikana. Immunohistokemiallisia laseja ei saanut siirtää lämpölevylle, koska se saattaa vahingoittaa antigeeniepitooppeja. Näytelasit vietiin lämpökaappiin (+37 °C), jossa näytteet kiinnittyvät lasille. Näytteiden käsittely on kuvattu kuvassa 10.



Yhteensä 100 lasia

*Kalr. = kalretiniini

KUVA 10. Näytteiden kulku

Immunohistokemian puolella työskentely aloitettiin tekemällä tietokoneella näytelaseihin tarrat. Tarrojen avulla näytteen identifiointi säilyy ja värjäyslaite tunnistaa halutun vasta-ainekäsittelyn.

Näytelasit asetettiin näytekalkkaan ja vietiin Jung Autostainer XL -värjäysautomaatin tekemään parafiinin poistoon ksyleenin ja laskevan alkoholisarjan avulla. Seuraavaksi näytteille suoritettiin UHP- pesu (3 x 2 min). Mikroaaltouunikäsittely (MikroMed T/T Mega -laite) tapahtui puskuriliuoksessa, jonka tarkoituksena on purkaa fiksaatiossa muodostuneet ristosillat ajan, pH:n ja korkean lämpötilan avulla (kuva 11).



KUVA 11. Esikäsitellyissä käytetty MikroMed T/T Mega -laite ja esikäsitteilymaljat (Kuva: Elina Virkkunen 2012)

Mikroaaltouunikäsittely tapahtui vasta-aineelle optimoidun ohjelman mukaisesti. Näytelasit siirrettiin kannellisiin astioihin, jossa oli näytteestä riippuen EDTA- tai sitraattiliuosta. Sytokeratiini 7 -värjäyksen lasit laitettiin ME22-ohjelmaan, jossa kuumennus tapahtui emäksisessä (pH 9) EDTA-liuoksessa. EDTA-liuoksessa käsiteltiin myös sytokeratiini 20- ja kalretiniinilasit, mutta ME9-ohjelmassa joka oli kestoltaan lyhyempi. TTF-1 -lasit laitettiin sitraattiliuokseen (pH6) MS22-ohjelmaan. Ohjelman päätyttyä astiat nostettiin vetokaappiin jäähtymään liuoksessaan ilman kantta. Kun lasit olivat jäähtyneet noin 20 minuutin ajan, niille tehtiin uudelleen UHP- huuhtelu (3 x 2 min).

Immunohistokemian värjäys suoritettiin LabVisionin Corporation- värjäysautomaatilla (kuva 12). Värjäyksessä käytettävät reagenssit ja vasta-aineet laitettiin etukäteen laitteeseen. Laitteen alapuolella kanistereissa olivat huuhteluissa käytettävät UHP -vesi ja PBS -liuos (sisältää TWEEN 20-liuosta) sekä tyhjät kanisterit jätettä ja ongelmajätettä varten.



KUVA 12. LabVision Corporation -värjäysautomaatti (Kuva: Elina Virkkunen 2012)

Vasta-aineet laimennettiin työohjeen mukaisesti Ultra Ab diluentilla ja lisäksi laitteeseen laitettiin HRP-, vetyperoksidi-, pre- ja post- blocking liuokset, negatiivinen kontrolliliuos ja merkkiaineena käytetty kromogeeni DAB (kuva 13). Kun kone oli hyväksynyt laitetut reagenssit, näytelasit siirrettiin automaatin nätekampoihin ja käynnistettiin värjäysohjelma.



KUVA 13. Testauksessa käytetyt vasta-aineet ja DAB-merkkiaine (Kuva: Elina Virkunen 2012)

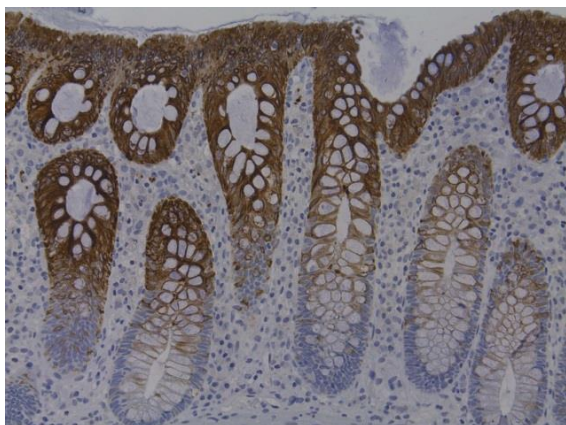
Kun immunohistokemian automaatti oli suorittanut värjäyksen, näytelasit siirrettiin takaisin kelkkoihin ja vietiin Jung Autostainer XL- värjäysautomaattiin tumavärjäykseen. Tumavärjäys tapahtuu Mayerin hematoksyliinillä työohjeen mukaisen laimennussuhteen mukaisesti. Värjäys tapahtui UHP- vedellä laimennetulla Mayerin hematoksyliinillä (1:1). Lopuksi lasit siirtyvät nousevan alkoholisarjan kautta ksyleeniin. Näytelasit päällystettiin peitinlaseilla Pertex-liiman avulla Leica CV 5030 -päällystysautomaatilla.

13 MIKROSKOPOINTI JA TULOKSET

Sairaalasolubiologi Reino Pitkänen antoi opastuksen immunohistokemiallisesti värjättyjen näytelasien tulkintaperiaatteisiin. Mikroskopointi tapahtui itsenäisesti muistiinpanoja tehden. Lopullinen tulosten arviointi tehtiin yhdessä ohjaajan kanssa.

Mikroskopoinnin tulokset kirjattiin jokaisen näytteen kohdalla arviointilomakkeeseen. Arviointilomakkeeseen merkittiin näytenumero, näytemuoto ja solublokista tehty diagnoosi, jos se oli tiedossa. Värjäystuloksen ollessa positiivinen, värjäytyminen arvioitiin kvalitatiivisesti plusmerkein (+/++/+++) värjäytyvyyden mukaan. Negatiivinen tulos ei sisältänyt värjäytyneitä soluja ja tulos merkittiin nollana (0). Lisäksi havaintoja kirjattiin ylös mikroskopoinnin aikana.

Jokaisessa värjäyserässä oli mukana positiiviset kontrollit kullekin antigeenille sekä yksi negatiivinen kontrolli, joilla kontrolloitiin menetelmän toimivuus. Nämä tarkastettiin aina näytteiden mikroskopoinnin yhteydessä, eikä niissä ollut ongelmia. Kuvassa 14 näkyy sytokeratiini 20 –värjäyksellä värjätty positiivinen kontrollileike. Kontrollikudoksena on paksusuolen limakalvoa. Kuvia värjäytystä näyteleikkeistä ei ole käsitelty, vaan ne on liitetty opinnäytetyöhön alkuperäisinä. Kaikki käytetyt kuvat on otettu samalla suurennuksella (200x) vertailun yhteneväisyyden tukemiseksi. Luotettavaa tilastollista analyysiä ei voida tehdä näytteiden vähäisen määrän takia. Mikroskopoinnin tulokset taulukoitiin antigeenikohtaisesti vertailun helpottamiseksi.



KUVA 14. Sytokeratiini 20:n positiivinen kontrolli (200x): paksusuolen limakalvo (Kuva: Reino Pitkänen 2013)

13.1. Sytokeratiini 7 ja 20

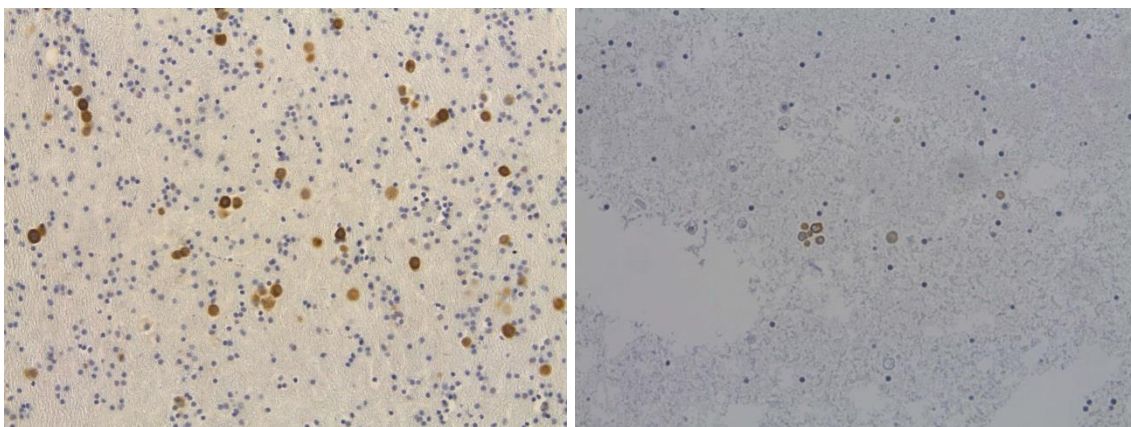
Käytetyistä antigeeneistä (taulukko 7) sytokeratiini 7:n kohdalla mikroskoopoinnin tulokset ovat kaikkein yhteneväisimmät. Kahden näytteen kohdalla on selvä ero värjäytymisen solujen laadussa. Kuvassa 15 näkyy näytteen numero 2 värjäytyminen sytokeratiini 7:llä alkuperäisessä solublokinäytteessä ja valmistetussa agarsolublokinäytteessä. Kuvasta 15 huomataan, että solublokinäytteessä on positiivisia soluja huomattavasti enemmän kuin agarsolublokinäytteessä ja värjäyksen voimakkuus on heikompi agarsolublokinäytteessä. Kuvassa 16 näkyy näytteen numero 7 värjäytyminen sytokeratiini 7:llä solu- ja agarsolublokinäytteessä. Vaikka agarsolublokinäytteessä näkyy positiivisia soluja vähemmän yhdessä näkökentässä, positiivisia soluja on tarpeeksi arvioimista varten ja ne ovat värjäytyneet yhtä voimakkaasti kuin solublokinäytteessä. Pisimpään fiksatiivissa olleen näytteen numero 8 värjäytyvyyttä agarsolublokkivalmisteesta ei pystytty arvioimaan ollenkaan solujen hajoamisen takia.

TAULUKKO 7. Sytokeratiini 7 –värjäys solublokki- ja agarsolublokinäytteissä

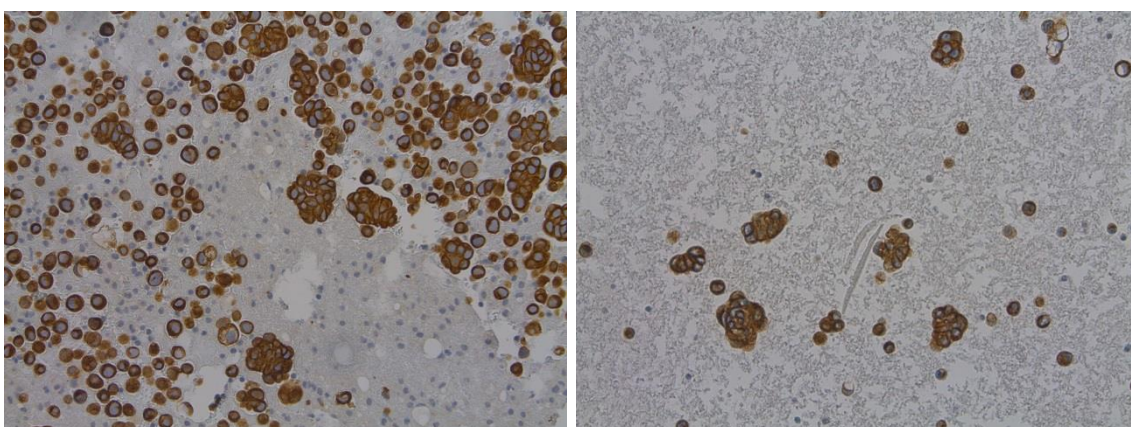
CK 7			
Näytenumero	Fiksoitumisaika (pv)	Solublokki	Agarsolublokki
1	2	+++	+++
2	6	+++	+
3	16	+++	++
4	21	+++	+++
5	43	+++	+++
6	47	+++	++/+++
7	54	+++	+++
8	69	++	—*
9	—**	++	++
10	—**	+++	+

*Näyte liian hajonnut arvioitavaksi

**Ei tiedossa



KUVA 15. Näyttenumero 2 (200x): vasemmalla sytokeratiini 7 –positiivinen solublokkinäyte ja oikealla sytokeratiini 7 –positiivinen agarsolublokkinäyte (Kuva: Reino Pitkänen 2013)



KUVA 16. Näyttenumero 7 (200x): vasemmalla sytokeratiini 7 -positiivinen solublokkinäyte ja oikealla sytokeratiini 7 –positiivinen agarsolublokkinäyte (Kuva: Reino Pitkänen 2013)

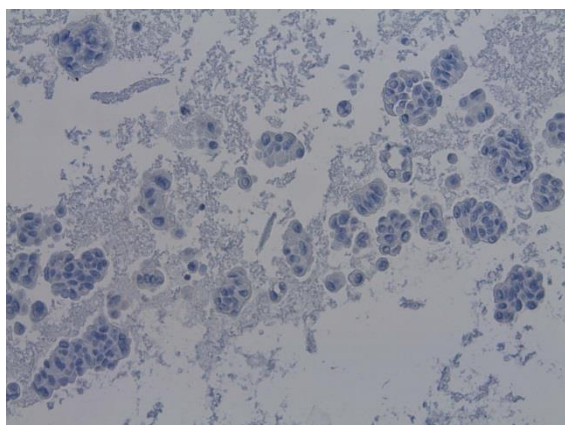
Sytokeratiini 20 kohdalla vain yksi alkuperäisistä solublokkinäytteistä oli hieman positiivinen, vastaava agarsolublokkinäyte ei värjäytynyt ollenkaan. Sytokeratiini 20:tä esiintyy ruuansulatuskanavan ja suolen epiteelisoluissa. Työssä ei ollut näytteitä sytokeratiini 20 -positiivisilta alueilta. Virheellisiä positiivisia tuloksia ei syntynyt agarsolublokkimenetelmällä sytokeratiini 20:tä testattaessa. Kuvassa 17 näkyy näytteen numero 7 negatiivinen värjäystulos sytokeratiini 20:llä.

TAULUKKO 8. Sytokeratiini 20 –värjäys solublokki- ja agarsolublokinäytteissä

CK 20			
Näytenumero	Fiksoitumisaika (pv)	Solublokki	Agarsolublokki
1	2	0	0
2	6	0	0
3	16	0	0
4	21	0	0
5	43	+	0
6	47	—***	—***
7	54	0	0
8	69	0	—*
9	—**	0	0
10	—**	0	0

*Näyte liian hajonnut arvioitavaksi, **Ei tiedossa

***Näytteestä ei määritetty tätä antigeeniä



KUVA 17. Näytenumero 7 (200x): sytokeratiini 20 –negatiivinen agarsolublokinäyte (Kuva: Reino Pitkänen 2013)

13.2. Kalretiniini ja TTF-1

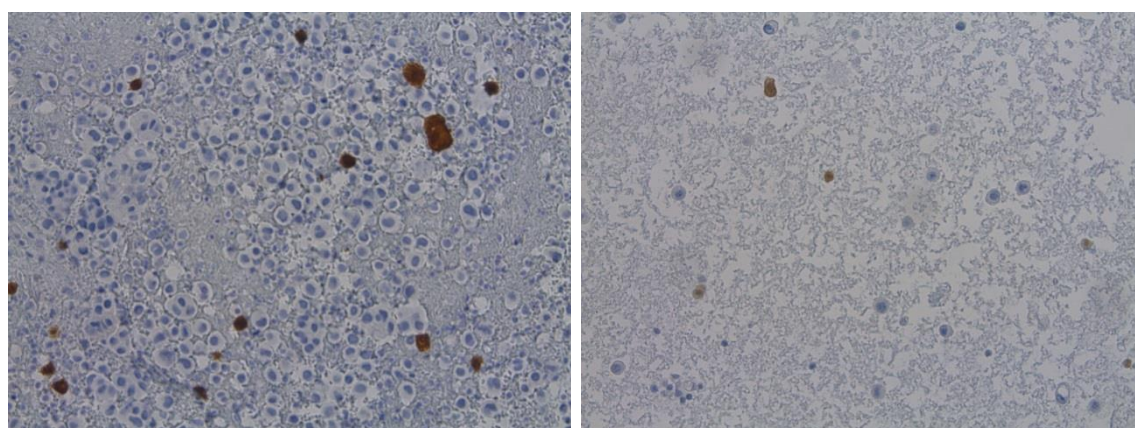
Kalretiniinin ja TTF-1 kohdalla tulokset olivat poikkeavia. Kalretiniinin kohdalla (taulukko 9) solublokinäytteistä positiivisia oli 6 kappaletta ja agarsolublokinäytteistä positiivisia oli 2 kappaletta. Vain toisen positiivisen näytteen kohdalla värjäytyminen oli

saman vahvuista. Toisen kohdalla värjäytyvyys oli heikompaa. Kuvassa 18 näkyy näytteen numero 7 värjäytyvyys kalretiniinilla. Vasemmalla näkyy solublokkinäytteen selkeästi värjäytyneet kalretiniini-positiiviset solut. Oikealla näkyy vain heikkoa värjäytyvyyttä, jota ei arvioitu edes positiiviseksi.

TAULUKKO 9. Kalretiniini-värjäys solublokki- ja agarsolublokkinäytteissä

Kalretiniini			
Näyttenumero	Fiksoitumisaika (pv)	Solublokki	Agarsolublokki
1	2	0	0
2	6	+++	0
3	16	+++	0
4	21	++	+
5	43	0	0
6	47	0	0
7	54	+++	0
8	69	+	—*
9	—**	++	0
10	—**	+++	+++

*Näyte liian hajonnut arvioitavaksi, **Ei tiedossa



KUVA 18. Näyttenumero 7 (200x): vasemmalla kalretiniini-positiivinen solublokkinäyte ja oikealla kalretiniini-negatiivinen agarsolublokkinäyte (Kuva: Reino Pitkänen 2013)

Taulukosta 10 näkyy, että solublokkinäytteistä kolme oli TTF-1 positiivisia ja agarsolublokkinäytteistä kaksi oli TTF-1 positiivisia. Työn otoskoko oli tässä kohdassa pieni, mutta tulokset parempia kuin kalretiniinilla. Kuvassa 19 näkyy näytteen numero 7 vär-

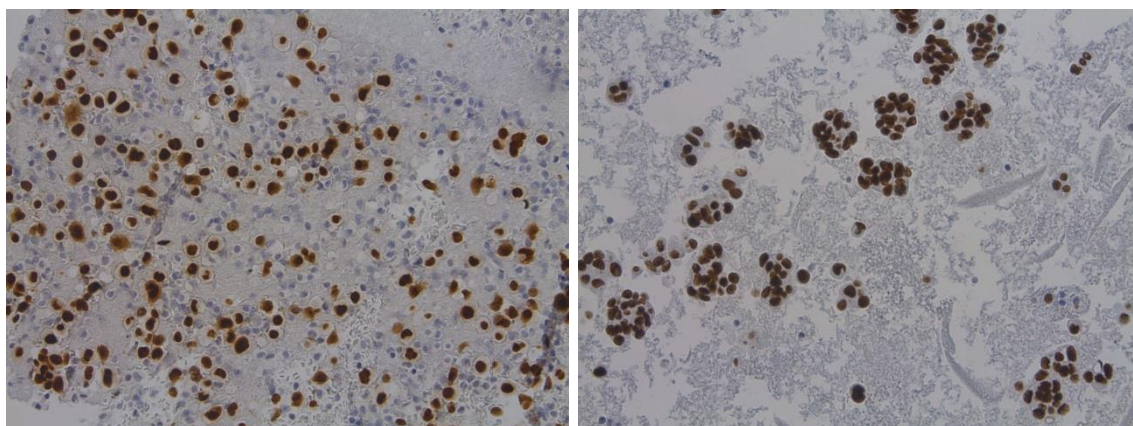
jäytyminen TTF-1:llä solu- ja agarsolublokinäytteissä. Solujen määrä agarsolublokinäytteessä on vähäisempi kuin solublokinäytteessä, mutta värjäytyminen on yhtä voimakasta kummallakin näytteen valmistustekniikalla. Näytteen 10 kohdalla värjäytyminen oli epäspesifistä. Näytteessä 10 solujen sytoplasma oli värjäytynyt voimakkaasti, vaikka värjäytymisen olisi pitänyt kohdentua solun tumaan. Kontrollinäyte oli värjäytynyt normaalisti eli värjäysmenetelmä oli toiminut oikein.

TAULUKKO 10. TTF-1 -värjäys solublokki- ja agarsolublokinäytteissä

TTF-1			
Näytenumero	Fiksoitumisaika (pv)	Solublokki	Agarsolublokki
1	2	0	0
2	6	0	0
3	16	0	0
4	21	0	0
5	43	+++	+++
6	47	+++	0
7	54	+++	+++
8	69	0	—*
9	—**	0	0
10	—**	—***	—***

*Näyte liian hajonnut arvioitavaksi, **Ei tiedossa

***Näytteessä epäspesifinen värjäytyminen



KUVA 19. Näyttenumero 7 (200x): vasemmalla TTF-1 –positiivinen solublokinäyte ja oikealla TTF-1 –positiivinen agarsolublokinäyte (Kuva: Reino Pitkänen 2013)

14 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia agarsolublokkimenetelmällä valmistettujen näytteiden immunohistokemiallista värjäytyvyyttä vertaamalla niitä käytössä olevalla solublokkimenetelmällä valmistettuihin näytteisiin. Työssä kuudesta pleuranäytteestä ja neljästä askitesnäytteestä valmistettiin agarsolublokkivalmiste. Pleura- ja askitesnäytteet olivat alkoholifiksoituja. Mahdollisuutta tuoreinäytteiden käsittelyyn ei tullut laboratoriotyöskentelyn aikana. Näytteistä tehtiin HE-värjäys morfologian tarkastelemiseksi ja paikannettiin neljä antigeeniä (sytokeratiini 7, sytokeratiini 20, kalretiniini ja TTF-1) immunohistokemiallisilla värjäyksillä.

Lopputuloksia tarkasteltaessa yhdessä sairaalasolubiologi Reino Pitkäsen kanssa, kävi ilmi, että tulokset olivat yhteneväisimmät sytokeratiini 7:n kohdalla. Kalretiniinin ja TTF-1:n kohdalla tuloksissa oli enemmän poikkeamia. Sytokeratiini 20 on negatiivinen työssä käytetyissä pleura- ja askitesnäytteissä. Sytokeratiini 20:n värjäystulos tukee agarsolublokkimenetelmän toimivuutta. Aiemmin tehdyissä opinnäytetöissä on tehty sytokeratiinien ja kalretiniinin kohdalla samansuuntaisia havaintoja. Sytokeratiinien antigeenit kestävät paremmin käsittelyä ja fiksaatiota kuin kalretiniini.

Mikroskopoitaessa huomattiin, että usean positiivisen näytteen kohdalla agarsolublokkivalmisteesta näkyi vähemmän värjäytyneitä soluja kuin solublokkivalmisteesta tai näytteestä ei löytynyt lainkaan positiivisuutta. Yksikään negatiivinen solublokkinäyte ei muuttunut positiiviseksi agarsolublokkimenetelmällä. Näytteistä oli tehty solublokkivalmiste ensimmäiseksi laadukkaan sytologisen diagnoosin takaamiseksi. Agarsolublokkivalmisteet tehtiin jäljelle jääneestä näytteestä, joten solublokki ja agarsolublokki sisältävät täysin eri solut, ja siksi ne eivät ole identtisiä vertailtaessa. Diagnoosiin tarvittavia soluja ei kaikkien näytteiden kohdalla ollut enää riittävästi jäljellä.

Osassa näytteistä havaittiin taustavärjäytymistä. Taustavärjäytymiselle on esitetty useita eri vaihtoehtoja, kuten esimerkiksi kudoksesta johtuvat tai sen fiksaatioon liittyvät syyt. Fiksaatio lisää näytteen hydrofobisuutta. Esikäsittely, käytetty vasta-aine ja endogeeninen peroksidaasi saattavat lisätä taustaa. Useiden vaihtoehtojen vuoksi epäspesifisten reaktioiden syiden selvittäminen on haastavaa. Syyn selvittämisessä tulee edetä systemaattisesti ja loogisesti. Tärkeä osa epäspesifisiä reaktioita selvitettäessä ovat värjäyk-

sessä mukana olleet kontrollit. Niiden avulla pystytään havaitsemaan itse värjäysmenetelmästä johtuvat ongelmat.

Joidenkin näytteiden kohdalla fiksaatioaika venyi säilytyksen takia pitkäksi. Pisimpään säilytetty näyte (numero 8) oli fiksoitunut 69 päivää ennen agarsolublokin tekemistä. Tämä näyte havaittiin mikroskopoidessa liian hajonneeksi, eikä värjäytymistä voitu arvioida. Toisaalta toiseksi pisimpään fiksoitunut näyte (numero 7) oli fiksoitunut 54 päivää ja sen kohdalla immunohistokemialliset värjäykset onnistuivat hyvin. Yleensä sytologisia näytteitä säilytetään laboratoriossa noin viikon ajan.

Solublokin valmistaminen sisältää useita vaiheita, joiden aikana näytemateriaali saattaa hävitä. Hävikin mahdollisuus kasvaa siirrettäessä solumateriaalia kudospussiin, kudokuljetuksen aikana sekä näytemateriaalia poistettaessa kudospussista. Lisäksi näytteen käsittely pinseteillä saattaa tuhota niitä. Agar suojaa näytettä sitä siirreltäessä histologisen prosessin eri vaiheissa.

Lopputulosta tarkasteltaessa havaittiin agariin valettujen näytteiden kohdalla pienen solumäärän hajaantuneen laajalle alueelle, mikä hankaloitti mikroskopointia. Käytetty agarin määrä täytyi suhteuttaa näytemäärän runsauteen. Agaria ei saa olla liikaa näytteen verrattuna. Sorvali suosittelee insinööriytyössään määräksi 3-5 tippaa agaria näytteestä riippuen (Sorvali 2005).

Työssä käytettiin näyteputkia muottina agarnäytteseokselle. Näytteen poissaanti putkesta oli haastavaa. Saimme asiantuntija-apua sairaalasolubiologi Marjukka Frimanilta, joka ehdotti ratkaisuksi agarvalmisteen tekemistä kuoppalevyllä näyteputken sijaan. Näin solut saataisiin tiiviimmäksi ja agarin määräkään ei pääsisi herkästi kasvamaan. Lisäksi agarsolunappi on helpompi irrottaa kuoppalevyttä.

Opinnäytetyön aikana otettiin sähköpostitse yhteyttä HUSLAB:ssa työskentelevään dosentti Leena Krogerukseen, joka kertoi heidän tämänhetkisestä toimintatavastaan patologian laboratoriossa. Laboratoriossa käytetään histoblokkimenetelmän (solublokki) lisäksi agarblokkimenetelmää (agarsolublokki), mutta agarin soluja laajalle levittävä ominaisuus on vähentänyt menetelmän käyttöä varsinkin niukkojen näytteiden kohdalla. Krogerus kertoi, trombiiniblokkimenetelmää käytetään yhä enemmän heillä patologian laboratoriossa. Trombiiniblokkimenetelmällä solut sijoittuvat tiheämmin lasille.

Työtä tehdessä perehdyttiin immunohistokemian menetelmiin ja effuusiidiagnostiikkaan. Sisältöä ja toteutusta suunniteltiin yhdessä patologian laboratorion henkilökunnan kanssa. Työ sisälsi kaikki patologian laboratorion osa-alueet sytologisesta näytteestä histologisen prosessoinnin kautta immunohistokemiallisiin värjäyksiin. Haasteena oli työn rajaaminen loogiseksi kokonaisuudeksi. Teorian ymmärtäminen vaatii perusteellisen syventymisen aiheeseen koulutusohjelmaan kuuluvien opintojen lisäksi. Teoria rajattiin käsittämään Keski-Suomen keskussairaalan patologian laboratoriossa käytössä oleviin menetelmiin.

Opinnäytetyön tulokset ovat samansuuntaisia aiheesta aikaisemmin tehtyjen opinnäytetöiden kanssa. Agarsolublokkimenetelmä toimii immunohistokemiallisissa värjäyksissä opinnäytetyössä käytettyjen antigeenien kohdalla. Kyseistä menetelmää käytetään HUSLAB:n patologian laboratoriossa trombiinisolublokkimenetelmän rinnalla (Krogerus 2012). Suokas & Tiuhonen ovat tehneet vuonna 2009 opinnäytetyön, jossa tuorenäytteistä on tehty trombiinisolublokkit. Näytteet on fiksoitu formaliinilla ennen kudoskuljetusta ja näin valmistetuilla näytteillä on saatu hyvät tulokset immunohistokemiallisissa värjäyksissä (Suokas & Tiuhonen 2009). Jatkotutkimuksen aiheeksi ehdotetaan trombiiniblokkimenetelmän toimivuuden selvittämistä immunohistokemiallisissa värjäyksissä sytologisilla näytteillä.

LÄHTEET

Aho, H. 2000. Sytologiset värjäykset. *Moodi* 24 (4-5), 142–147.

Aho, H. 2005. Luokituserusteita. International Academy of Pathology. Suomen osasto. Julkaistu 3.1.2005. Luettu 6.1.2013.
<http://www.terveysportti.fi/kotisivut/docs/f18047/iapluokitus2005.pdf>.

Anttila, S., Kaarteenaho, R. & Pääkkö, P. 2012. Maligni mesoteliooma. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V- M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) *Patologia*. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 561–562.

Boenisch, T. 2009. Basic Enzymology. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) *Immunohistochemical Staining Methods*. 5. uudistettu painos. Carpinteria, CA: Dako North America, 16–17.

Brunzel, N. 2004. *Fundamentals of urin & body fluid analysis*. Second edition. USA: Saunders, 362.

Couture, R. & Hafer, L. J. 2004. *Staining Methods: Nucleus and Cytoplasm*. Teoksessa Wulff, S. (toim.) *Guide to Special Stains*. Carpinteria, CA: DakoCytomation, 24–25.

Dabbs, D. J. 2006. *Immunohistology of Metastatic Carcinoma of Unknown Primary*. Teoksessa Dabbs, D. J. (toim.) *Diagnostic Immunohistochemistry*. 2.painos. London: Curchill Livingstone, 183–184.

Friman, M. Sairaalasolubiologi. 15.7.2012. Henkilökohtainen tiedonanto. Jyväskylä, Keski-Suomen keskussairaala, patologian laboratorio.

Gamble, M. 2008. The Hematoxylin and Eosin. Teoksessa Bancroft, J. D. & Gamble, M. (toim.) *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6.painos. London: Curchill Livingstone, 121, 126.

Grizzle, W. E., Fredenburg, J. L. & Myers, R. B. 2008, Fixation of Tissues. Teoksessa Bancroft, J. D. & Gamble, M. (toim.) *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6.painos. London: Curchill Livingstone, 53–56.

Halme, M. 2005. Keuhkopussinsairaudet. Teoksessa Kinnula, V., Brander, P.E., & Tuikiainen, P. (toim.) *Keuhkosairaudet*. 3.painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 598–602.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja Kirjoita. 15. uudistettu painos. Helsinki: Tammi, 23–27, 134–140, 231–233.

Hladik, C. L. & White, C. L. 2008. Immunohistochemistry Quality Control. Teoksessa Bancroft, J. D. & Gamble, M. (toim.) *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6.painos. London: Curchill Livingstone, 481–488.

Holli, K. & Saarto, T. 2009. Askites. *Syöpäsairaudet*. Julkaistu 25.6.2009. Luettu 11.1.2013.
http://www.terveysportti.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=syo00872&p_haku=askites.

- Holliday, J. M. 2004. Fixation and Tissue Processing. Teoksessa Wulff, S. (toim.) Guide to Special Stains. Carpinteria, CA: DakoCytomation, 16–22, 24–25.
- Hopwood, D. 2003. Fixation and fixatives. Teoksessa Bancroft, J.D. & Gamble, M. (toim.) Theory and Practice of Histological Techniques. 5.painos. London: Curchill Livingstone, 63–65.
- Huuskonen, M., Jahkola, A. & Oksa, P. 2009. Asbestisairaudet. Lääkärin tietokannat. Päivitetty 3.6.2009. Luettu 3.1.2013. http://www.terveysportti.fi.ezproxy.jamk.fi:2048/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00186&p_haku=asbestisairaudet.
- Ikedo, K. Tate, G., Suzuki, T. & Mitsuya, T. 2011. Comparison of Immunocytochemical Sensitivity Between Formalin-Fixed and Alcohol-Fixed Specimens Reveals the Diagnostic Value of Alcohol-Fixed Cytocentrifuged Preparations in Malignant Effusion Cytology. Päivitetty 2011. Luettu 20.12.2012. <http://171.67.112.51/content/136/6/934.full.pdf+html>.
- Jackson, P. & Blythe, D. 2008. Immunohistochemical Techniques. Teoksessa Bancroft, J. D. & Gamble, M. (toim.) Theory and Practice of Histological Techniques. 6.painos. London: Curchill Livingstone, 433–472.
- Kerstens, H. M. J., Robben, J. C. M., Poddighe, P. J., Melchers, W. J. G., Boonstra, H., de Wilde, P. C. M., Macville, M. V. E. & Hanselaar, A. G. J. M. 2000. AgarCyto: A Novel Cell-processing Method for Multiple Molecular Diagnostic Analyses of the Uterine Cervix. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. Julkaistu 1.5.2000. Tulostettu 1.1.2013. <http://jhc.sagepub.com/content/48/5/709.long>.
- Key, M. 2009. Immunohistochemistry Staining Methods. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) Immunohistochemical Staining Methods. 5. uudistettu painos. Carpinteria, CA: Dako North America, 57–59.
- Kirjavainen, S. 2013. Esivalmistelut immunoentsyymivärjäyksiä varten. Teoksessa Naukkarinen, A. (toim.) Immunohistokemian peruskurssi. 7. painos. Itä-Suomen yliopisto. Koulutus- ja kehittämispalvelu Aducate, 28, 31.
- Krogerus, L. Dosentti. 2.2.2012. Sähköposti. Helsinki, HUSLAB.
- KSSH. 2012a. Cell Block- valmiste. Sytologiset menetelmät. Patologian osasto. Päivitetty 16.1.2012.
- KSSH. 2012b. Värjäysohje BrightVision+ -kitille. työohje: immunohistokemia. Patologian osasto. Päivitetty 9.8.2012.
- Kumar, G. & Rudbeck, L. 2009. Demasking of Antigens. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) Immunohistochemical Staining Methods. 5. uudistettu painos. Carpinteria, CA: Dako North America, 51–52.
- Laasonen, A. 2001. Esivalmistelut immunohistokemiallista värjäystä varten. Teoksessa Naukkarinen, A. (toim.) Immunohistokemian peruskurssi. 2.painos. Kuopion yliopisto. Koulutus- ja kehittämiskeskus, 12–17.

Lappi-Blanco, E., Mäkinen, J. M., Jartti, A., Mali, P. & Kaarteenaho, R. 2012a. Keuhkosyöpien tarkentuva diagnostiikka. Julkaistu 2012. Luettu 12.12.2012. http://www.terveysportti.fi.ezproxy.jamk.fi:2048/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=duo10588&p_haku=keuhkosy%C3%B6pien%20tarkentuva%20diagnostiikka.

Lappi-Blanco, E., Mäkinen, J. M., Pirinen, R., Kosma, V-M. & Pääkkö, P. 2012b. Keuhkon adenokarsinooma. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V- M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 551–553.

Lehto, V-P & Stenbäck F. 2012a. Kasvainten nimeämisen perusteet. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V- M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 231–233.

Lehto, V-P & Stenbäck F. 2012b. Hyvän- ja pahanlaatuisten kasvainten erot. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V- M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 233–236.

Mali, P., Ojala, A & Salo, J. A. 2007. Keuhkosyöpä. Teoksessa Joensuu, H., Roberts, P. J., Teppo, L. & Tenhunen, M. Syöpätaudit. 3. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 278–280.

Marian sairaala. 2003. Solublokki agar-menetelmällä. Patologian osasto. Päivitetty 23.7.2003.

Menetelmäpolku. 2012. Jyväskylän yliopiston koppa. Luettu 20.2.2012. <https://koppa.jyu.fi/avoimet/hum/menetelmapolkuja/menetelmapolku>.

Mäkinen, M. 2012. Näytteiden käsittely laboratoriossa. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V- M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 1127–1129.

Mäkinen, M. & Lehto, V-P. 2012a. Modernin patologian synty. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V- M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 11.

Mäkinen, M. & Lehto, V-P. 2012b. Patologian varhaisvaiheet. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V- M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 10.

Mäkinen, M. & Stenbäck, F. 2012a. Immunohistokemiallinen diagnostiikka. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V- M., Lehto, V-P., Paavonen, T & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 1133–1135.

Mäkinen, M. & Stenbäck, F. 2012b. Näyttemateriaalin asettamat rajoitukset immunohistokemiallisessa diagnostiikassa. Duodecim. Julkaistu 2.2.2012. Luettu 19.12.2012. http://www.terveysportti.fi.ezproxy.jamk.fi:2048/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=pat00861&p_haku=n%C3%A4yttemateriaalin%20asettamat%20rajoitukset.

Nathan, N. A., Narayan, E., Smith, M. M. & Horn, M. J. 2000. Improved Preparation and Its Efficacy in Diagnostic Cytology. American Society for Clinical Pathology. Julkaistu 2000. Tulostettu 12.12.2012. <http://ajcp.ascpjournals.org/content/114/4/599.long>.

Nau, K. C. & Lewis, W. D. 2008. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. Julkaisu 1.10.2008. Luettu 17.2.2013. <http://www.aafp.org/afp/2008/1001/p853.html>.

Naukkarinen, A. 2000. Histologiset värjäykset. Moodi 4–5 (24), 153–158.

Naukkarinen, A. 2006a. Histologisen näytteen kiinnittäminen. Teoksessa Naukkarinen, A. (toim.) Histologiset menetelmät. 8. uusittu painos. Kuopion yliopisto. Koulutus- ja kehittämiskeskus, 7–10.

Naukkarinen, A. 2006b. Histologisten värjäysten teoriaa. Teoksessa Naukkarinen, A. (toim.) Histologiset menetelmät. 8. uusittu painos. Kuopion yliopisto. Koulutus- ja kehittämiskeskus, 39–40.

NordiQC. 2009. Thyroid transcription factor – 1 (TTF1). Julkaistu 4.1.2009. Luettu 6.1.2013. <http://www.nordiqc.org/Epitopes/TTF/TTF.htm>.

NordiQC. 2011. Calretinin. Julkaistu 19.11.2011. Luettu 6.1.2013. <http://www.nordiqc.org/Epitopes/calretinin/calretinin.htm>.

NordiQC. 2012. Cytokeratins. Julkaistu 14.11.2012. Luettu 6.1.2013. <http://www.nordiqc.org/Epitopes/Cytokeratins/Cytokeratins.htm>.

Pirinen, R., Lappi-Blanco, E., Mäkinen, J., Kosma, V-M. & Pääkkö, P. 2012. Keuhko-
kasvaimet. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V- M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.). Patologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 547 – 550.

Pitkänen, R. Sairaalasolubiologi. 11.4.2012. Henkilökohtainen tiedonanto. Jyväskylä, Keski-Suomen keskussairaala, patologian laboratorio.

Rantala, I. 2001. Immunoentsyymimenetelmien perusteet. Teoksessa Naukkarinen, A. (toim.) Immunohistokemian peruskurssi. 2.painos. Kuopion yliopisto. Koulutus- ja kehittämiskeskus, 18–33.

Rantala, I. & Laasonen, A. 2000. Immunohistokemialliset värjäykset. Moodi 24 (4–5), 148–152.

Rasmussen, O. F. 2009. Controls. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) Immunohistochemical Staining Methods. 5. uudistettu painos. Carpinteria, CA: Dako North America, 127–130.

Riska, H. & Saarelainen, S. 2011. Nestettä pleurassa - ongelmasta hoitoon. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. Luettu 11.1.2013. http://www.terveysportti.fi.ezproxy.jamk.fi:2048/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=duo99314&p_haku=pleura.

Sand, O., Sjaastad, Ø., Haug, E., Bjälle, J. & Toverud, K. 2011. Ihminen: Fysiologia ja Anatomia. 1.painos. Helsinki: WSOYpro Oy, 361–362, 384–387.

Saukkonen, P. 2006. Tutkielmanteon tukisivut. Helsingin yliopiston yleisen valtiopainlaitos. Luettu 5.3.2013.
<http://www.mv.helsinki.fi/home/psaukkon/tutkielma/index.html>.

Seppälä, I. J. T. 2005. Vasta-aineet eli immunoglobuliinit. Teoksessa Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A. & Valtonen, V. (toim.) Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. 1.painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 624–635.

Seuna, S. 2002. Etanoli-, Formaliini- ja CytoLyt® -fiksaation sekä ilmakeiuaamisen vaikutus pleuranesteiden immunosytokemialliseen värjäytyvyyteen ABC – menetelmässä. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Helsingin ammattikorkeakoulu Stadia. Opinnäytetyö.

Sorvali, K. 2005. Agar- vs. trombiinisolublokki. Moodi 29 (4), 141–143.

Spencer, L. T. & Bangroft, J. D. 2008. Tissue Processing. Teoksessa Bancroft, J. D. & Gamble, M. (toim.) Theory and Practice of Histological Techniques. 6.painos. London: Curchill Livingstone, 83–87, 93–95.

Suokas, L. & Tiihonen, E. 2009. Fiksatiivikokeilu pleura- ja askitesnäytteiden immunosytokemiallisissa värjäyksissä. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Taskinen, E. 1994. Pleura- ja askitesnesteiden irtosolututkimukset. Teoksessa Koivunieni, A. (toim.). Kliininen sytologia: Irtosolu-, harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 297–318.

Thermo Scientific. 2010. Keratin 7 Ab-2. Data Sheet. Päivitetty 29.3.2010.

Thermo Scientific. 2011a. Calretinin Ab-1. Data Sheet. Päivitetty 9.12.2011.

Thermo Scientific. 2011b. Keratin 20 Ab-1. Data Sheet. Päivitetty 8.12.2011.

Tietosuoja. 2012. Päivitetty 2.1.2012. Keski-Suomen Sairaanhoidopiiri. Luettu 20.2.2012. <http://www.ksshp.fi/Public/default.aspx?nodeid=36243&culture=fi-FI&contentlan=1>.

Varpula, J. 2007. Plasma-trombiinisaostus solublokin valmistuksessa. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Turun ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Wendelboe, H. G. & Bisgaard, K. 2009. Background. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) Immunohistochemical Staining Methods. 5. uudistettu painos. Carpinteria, CA: Dako North America, 115–121.

Zanini, C., Gerbaudo, E., Ercole, E., Vendramin, A. & Forni, M. 2012. Evaluation of two commercial and three home-made fixatives for the substitution of formalin: a formaldehyde-free laboratory is possible. Environmental Health . Julkaistu 4.9.2012. Luettu 2.1.2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3506558/>.